

**ZUR SYNERGISTISCHEN WIRKUNG
AROMATISCHER AMINE
BEI DER INITIIERUNG
VON TUMOREN
IN DER RATTENLEBER**

Roland Hammerl

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0113

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Würzburg

Vorstände :

Prof. Dr. D. Henschler Prof. Dr. Drs. h.c. U. Trendelenburg

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. H.G. Neumann

vorgelegt über

Prof. Dr. A. Petter

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

ZUR SYNERGISTISCHEN WIRKUNG AROMATISCHER AMINE BEI DER
INITIIERUNG VON TUMOREN IN DER RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Roland Hammerl

aus
Würzburg

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Univ.-Prof. Dr. A. Petter
Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht zum Thema	3
2.1. Die kanzerogene Wirkung aromatischer Amine	3
2.1.1. Allgemeine Bedeutung	3
2.1.2. Trans-4-Acetylaminostilben und 2-Acetylaminofluoren	3
2.1.3. DNA-Schädigung von AAS und AAF	4
2.2. Mehrstufentheorie der Krebsentstehung	5
2.3. Initiations-Promotions-Versuche	6
2.3.1. Die Rattenleber in Initiations-Promotions-Versuchen	6
2.3.2. Charakterisierung von Initiatoren und Promotoren	8
2.3.3. Einsatz und Wirkung bestimmter Promotoren	9
2.4. Die Patho-Histologie bei der Entstehung von Lebertumoren	10
2.4.1. Morphologische Beurteilungskriterien	10
2.4.2. Enzymatische Marker der Hepatokanzerogenese	11
2.4.3. Die plazentare Glutathion-S-Transferase	12
2.5. Synergismus mehrerer Kanzerogene	14
3. Material und Methoden	17
3.1. Verwendete Substanzen	17
3.2. Versuchstiere	17
3.3. Versuchsanordnung	18
3.4. Dosierungen	21
3.5. Partielle Hepatektomie	22
3.6. Untersuchung und Gewichtsbeobachtung	23

3.7.	Gewinnung und Asservierung der Gewebe	24
3.8.	Herstellung der histologischen Schnitte	24
3.9.	Histologische und morphometrische Auswertung	26
3.10.	Statistik	27
4.	Ergebnisse	29
4.1.	Initiations-Promotionsversuch mit erwachsenen Ratten	29
4.1.1.	Beobachtungen über den Zustand der Versuchstiere	29
4.1.1.1.	Gewichtsentwicklung	29
4.1.1.2.	Lebergewichte und Beobachtungen bei der Gewebsentnahme	30
4.1.1.3.	Gesundheitszustand der Versuchstiere	32
4.1.2.	Histologische Auswertung	33
4.1.2.1.	Allgemeinzustand der Gewebe	33
4.1.2.2.	Charakterisierung der fokalen Veränderungen	33
4.1.2.3.	Quantifizierung der herdförmigen Läsionen	38
4.2.	Initiations-Promotions-Versuch mit neugeborenen Ratten	46
4.2.1.	Beobachtungen über den Zustand der Versuchstiere	46
4.2.1.1.	Gewichtsentwicklung	46
4.2.1.2.	Lebergewichte und Beobachtungen bei der Gewebsentnahme	49
4.2.1.3.	Gesundheitszustand der Versuchstiere	49
4.2.2.	Histologische Auswertung	51
4.2.2.1.	Allgemeinzustand der Gewebe	51
4.2.2.2.	Charakterisierung der fokalen Läsionen	51
4.2.2.3.	Quantitative Auswertung des Versuches mit	

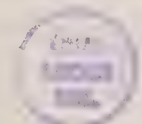
neugeborenen männlichen Ratten	52
4.2.2.4.Quantitative Auswertung des Versuches mit neugeborenen weiblichen Ratten	56
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung / Summary	66
7. Literaturverzeichnis	70

Verwendete Abkürzungen:

AAF	2-Acetylaminofluoren
AAP	2-Acetylaminophenanthren
AAS	trans-4-Acetylaminostilben
ATPase	Adenosintriphosphatase
DEN	Diäthylnitrosamin
GGT	gamma-Glutamyltranspeptidase
GST-P	plazentare Glutathion-S-Transferase
G-6-Pase	Glukose-6-Phosphatase
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HFA	Herdflächenanteil
KG	Körpergewicht
PB	Phenobarbital
PH	partielle Hepatektomie
SE	Standardfehler ($s:\sqrt{n}$)

1) EINLEITUNG

Zahlreiche aromatische Amine erzeugen beim Menschen und bei Versuchstieren Krebs. Als wesentliche Ursache dafür wird die gentoxische Wirkung ihrer Metaboliten angesehen, durch die irreversibel veränderte Zellen erzeugt werden. Daraus folgt die grundlegende Frage, ob sich die durch verschiedene Kanzerogene erzeugten und der Initiation von Tumoren zugerechneten Schäden addieren können. In dieser Frage liegen Ergebnisse aus einem Initiations-Promotions-Experiment (KUCHLBAUER et al. 1985) vor, bei dem zwei Modellverbindungen aus der Gruppe der aromatischen Amine, nämlich trans-4-Acetylaminostilben (AAS) und 2-Acetylaminofluoren (AAF) in einer als Initiation bezeichneten Phase von 4 Wochen verabreicht wurden. Darauf folgte eine für alle Tiere gleiche Promotionsbehandlung, bestehend aus einer partiellen Hepatektomie und der Verabfolgung von 250 ppm Phenobarbital im Trinkwasser. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Lebern histologisch auf enzymveränderte Herde und hyperplastische Knoten, als frühe Indikatoren für die Kanzerogenese, untersucht. Wurden die beiden Substanzen nacheinander gegeben, so war der Effekt deutlich größer, als durch jede der beiden alleine. Das Resultat wurde als überadditiv interpretiert. Überraschenderweise hing das Ergebnis aber auch von der Reihenfolge ab, in der beide Substanzen eingesetzt wurden. Die Kombination AAS-AAF war wirksamer als die Kombination AAF-AAS. Dieser Sachverhalt wurde als Bestätigung der Arbeitshypothese, daß AAS für die Rattenleber ein starker Initiator ist, AAF zusätzlich aber promovierende Eigenschaften besitzt, angesehen.



Ein Einwand gegen den Versuch bestand darin, daß die Einzelsubstanzen nur in der Anordnung AAS-Lösungsmittel und Lösungsmittel-AAF geprüft worden waren, also nicht gezeigt wurde, ob eine Verdopplung der Dosis nach der Versuchsanordnung AAS-AAS und AAF-AAF tatsächlich den erwarteten additiven Effekt haben würde. Es war deshalb Aufgabe dieser Arbeit, dies und die Abhängigkeit der Effekte von der Reihenfolge der Kombination beider Kanzerogene zu überprüfen. Dabei sollte gleichzeitig die Eignung der plazentaren Form der Glutathion-S-Transferase (GST-P) als immunhistochemischer Marker für präneoplastische Herde erprobt werden. Die Darstellung der GST-P sollte am nativgefrorenen Lebergewebe vorgenommen werden.

Außerdem war die Aufgabe gestellt, ein neues Initiations-Promotions-Modell zu untersuchen, bei dem - auch im Sinne des Tierschutzes - die partielle Hepatektomie durch die Verwendung neugeborener Tiere ersetzt wird. Bei neonaten Ratten proliferiert die Leber in den ersten drei Lebenswochen ohnehin stark. In diesem Modell sollten auch Unterschiede zwischen der sequentiellen und der gleichzeitigen Verabfolgung von AAS und AAF untersucht werden.

2. LITERATURÜBERSICHT ZUM THEMA

2.1. Die kanzerogene Wirkung aromatischer Amine

2.1.1. Allgemeine Bedeutung

Vor beinahe 100 Jahren wurde die krebserregende Wirkung aromatischer Amine zum erstenmal beobachtet. Der Frankfurter Pathologe REHN stellte bei Fabrikarbeitern, die mit der Herstellung von Fuchsin beschäftigt waren, das vermehrte Auftreten von Blasen Tumoren fest (1895). Für die Entstehung der Tumoren waren, wie sich später herausstellte, 4-Aminobiphenyl und 2-Naphtylamin verantwortlich. Im Tierversuch konnten mit Gesamtdosen dieser Substanzen von 0,1 bis 1 g/kg Tumoren erzeugt werden (NEUMANN 1987). Die meisten aromatischen Amine entstehen bei chemischen Syntheseprozessen, natürliche Expositionen sind relativ selten. Ernährungstoxikologische Bedeutung besitzen Pyrolyseprodukte einiger Aminosäuren, die beim Grillen von Fleisch entstehen und mutagen (HASHIMOTO et al. 1978) bzw. krebs-erzeugend sind (NEBERT et al. 1979). Ihre ausgeprägte Organotropie macht aromatische Amine für experimentelle Untersuchungen interessant, da Organmodelle zur Erzeugung von Tumoren zur Verfügung stehen.

2.1.2. Trans-4-Acetylaminostilben und 2-Acetylaminofluoren

Neben praktisch bedeutsamen Vertretern dieser Stoffgruppe stehen seit langem auch Modellverbindungen, wie 2-Acetylamino-

fluoren (AAF), trans-4-Acetylaminostilben (AAS) und 2-Acetylaminophenanthren (AAP), im Blickpunkt der Tumorforschung. AAF war ursprünglich als Insektizid entwickelt worden, gelangte aber aufgrund seines toxischen und krebserregenden Potentials nicht in den Handel (WILSON et al. 1941). Es erzeugt bei vielen Tierarten Tumoren in verschiedenen Geweben, wie Leber, Milchdrüse, Darmtrakt, Blase und Gehörgang (NEUMANN 1986). Die krebserregende Wirkung von 4-Aminostilben und seinen Derivaten, die eng an die trans-Konfiguration gebunden ist, wurde bereits kurz nach dem Zweiten Weltkrieg gefunden (HADDOW et al. 1948, SCHMÄHL und MECKE 1956). Trans-4-Acetylaminostilben führt bei der Ratte zu Tumoren der Talgdrüsen (ANDERSEN et al. 1964, NEUMANN et al. 1970), speziell der Zymbaldrüse, die in der Regio periauricularis gelegen ist. Selten sind andere Organe betroffen. Außerdem wurde die akut-toxische Wirkung des dem AAS verwandten trans-4-Dimethylaminostilben untersucht (MARQUARDT et al. 1985). Dabei wurde eine LD-50 von 50 mg/kg ermittelt. Die Tiere starben innerhalb einer Latenzperiode von elf Tagen an den Symptomen einer akuten Anämie. Bei der pathologischen Untersuchung konnten Läsionen der Magenschleimhaut und Schädigung des Knochenmarkes, aber keine auffälligen Leberveränderungen gefunden werden.

2.1.3. DNA-Schädigung durch AAS und AAF

Die Schädigung der DNA ist wesentliche Voraussetzung für die krebserregende Wirkung aromatischer Amine (MILLER und MILLER 1969). Sie wird durch reaktionsfähige Metaboliten erzeugt, die im Stoffwechsel entstehen. Dabei besitzt zunächst die N-Oxidation durch Cytochrom P-448 große Bedeutung (CRAMER et al.

1960). Die dabei entstehenden N-Hydroxylamine, oder Hydroxamsäuren werden durch Veresterung weiter aktiviert. Die reaktiven ultimalen Metaboliten reagieren mit den Basen der DNA (NEUMANN 1986). Bei AAF entstehen vor allem drei verschiedene Addukte des Guanins (KRIEK 1969), bei AAS werden ebenfalls mehrere Addukte nachgewiesen. Dabei sind zyklische Guaninaddukte, die bisher in vitro identifiziert wurden, besonders interessant (FRANZ und NEUMANN 1986, FRANZ et al. 1986).

2.2. Mehrstufentheorie der Krebsentstehung

Aus Versuchen an der Mäusehaut, bei denen mit einer für sich subkanzerogenen Dosis polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe erst dann Tumoren zu erzeugen waren, wenn auf diese erste Behandlung wiederholte Anwendung von Crotonöl folgte, schlossen BERENBLUM und SHUBIK (1947), daß bei der Krebsentstehung zwei Phasen zu unterscheiden sind. Sie werden heute als Initiations- und Promotionsphase bezeichnet und ließen sich auch an der Rattenleber demonstrieren (PERAINO et al. 1971). In diesem Fall entstanden mehr Tumoren, wenn die Tiere im Anschluß an AAF mit Phenobarbital (PB) behandelt wurden, als mit AAF alleine. Ausschließliche PB-Applikation ließ keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle erkennen. Daraus schloß man, daß PB den initial durch AAF bewirkten Schaden verstärkte, ohne selbst direkt zu initiieren (PERAINO et al. 1971). Durch Versuche mit unterschiedlichen Dosen konnte gezeigt werden, daß der "Promotor" PB tatsächlich weder initiiierende Aktivität besaß, noch Einfluß auf Art und spezifischen Charakter der entstehenden Neoplasien nahm, sondern nur die Wahrscheinlichkeit

ihres Auftretens steigerte (PERAINO et al. 1973 ,PERAINO et al. 1980).

Seitdem wird in der Krebsforschung das Initiations-Promotions-Konzept auch am Rattenlebermodell untersucht. Wenngleich nicht alle Beobachtungen sich nahtlos in diese Vorstellung einbeziehen lassen, liefert sie doch für die meisten Fragestellungen nachvollziehbare Erklärungen. Unter dem Begriff Initiation wird dabei das Entstehen eines irreversiblen DNA-Schadens verstanden, der schon durch Einzeldosen eines als Initiator wirkenden Kanzerogens erzeugt wird, und nur durch Stoffwechsel und zell-eigene Repairmechanismen beeinflussbar ist. Mehrere Einzeldosen summieren sich in ihrer Schadwirkung.

Um aus initiierten Zellen Tumoren zu erzeugen, sind sogenannte Promotoren nötig, die allein nicht krebserregend sind, die kontinuierlich über einen längeren Zeitraum einwirken müssen, deren Schaden begrenzt reversibel ist, und deren Wirkungen durch Hormonstatus, Umwelt und Nahrung beeinflusst werden. Man kann reine Initiatoren oder Promotoren von kompletten Kanzerogenen, die beide Wirkungen besitzen und ohne äußere Einflüsse, alleine Krebs erzeugen, unterscheiden (NEUMANN 1987).

2.3. Initiations-Promotions-Versuche

2.3.1. Die Rattenleber in Initiations-Promotions-Versuchen

Neben der Mäusehaut ist die Rattenleber - wie bereits erwähnt - eines der am häufigsten angewendeten Modellsysteme in der experimentellen Krebsforschung. Zur Unterscheidung initiiierender und promovierender Eigenschaften vieler Stoffe, wurden die Versuchsanordnungen vielfach variiert.

SOLT und FARBER (1976) benutzten als Initiator eine vergleichsweise hohe Dosis Diäthylnitrosamin (DEN). Danach behandelten sie 14 Tage lang mit 0,02 % AAF im Futter und führten außerdem eine partielle Hepatektomie, als weiteren Promotorreiz, durch. Nach GHOSHAL und Mitarbeitern (1983) verschafft AAF dabei den initiierten Hepatozyten einen selektiven Wachstumsvorteil, indem es normale Leberzellen in der Mitose stärker behindert. Mit Hilfe des Solt-Farber-Modells wurde eine ganze Reihe chemischer Substanzen, unter anderem verschiedene Steroidhormone, hinsichtlich ihrer Initiations- und Promotionswirkung getestet (ITO et al. 1983 , TSUDA et al. 1984).

PITOT und Mitarbeiter (1978) benutzten zur Initiation niedrige DEN-Dosisierungen von weniger als 20 mg/kg, die 24 Stunden nach einer Zweidrittelhepatektomie gegeben wurden. Die Promotion erfolgte mit PB über mehrere Monate. Die partielle Hepatektomie ruft eine Zellproliferation hervor, die in diesem Falle den initial gesetzten Schaden fixiert und damit die Initiation verstärkt (COLOMBANO et al. 1981).

PERAINO und Mitarbeiter (1981) setzten zum erstenmal neugeborene Ratten ein und ersetzten damit den, durch partielle Hepatektomie künstlich erzeugten Proliferationsstimulus, durch den in den ersten drei Wochen natürlicherweise vorhandenen. Die dadurch verursachte Empfindlichkeit wurde auch beim Nachweis der linearen Dosisabhängigkeit des gentoxischen Effektes von Vinylchlorid ausgenutzt (LAIB et al. 1984, LAIB et al. 1985).

2.3.2. Charakterisierung von Initiatoren und Promotoren

Für die Risikobeurteilung einzelner Stoffe ist die Kenntnis ihrer Initiator- und/oder Promotoreigenschaften von grundlegender Bedeutung. Deswegen wird versucht dieselben experimentell zu ermitteln (TATEMATSU et al. 1983). An der Rattenleber wurden, neben Nitrosaminen und aromatischen Aminen, auch polyzyklische Kohlenwasserstoffe auf ihre initiiierende Wirkung getestet. Zudem wurden einige bekannte Promotoren, darunter PB, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die initiierte Rattenleber geprüft. Als Grundschema diente eine 14tägige Behandlung mit AAF, die durch eine Gewebstekrosen erzeugende Tetrachlorkohlenstoff-Dosis und zum Teil durch eine partielle Hepatektomie ergänzt wurde. Die zu untersuchenden Stoffe wurden während 6 Wochen vor dieser Behandlung gegeben, um Leberzellen zu initiieren, oder während 6 Wochen danach appliziert, um ihre promovierende Wirkung auf die durch die Grundbehandlung initiierten Zellen abzuklären.

Mit Hilfe von Initiations- und Promotionsindices wird seit kurzem versucht, die Effekte auch quantitativ zu erfassen (PITOT und CAMPBELL 1987). Der hierzu eingeführte Initiationsindex orientiert sich an der Anzahl erzeugter patho-histologischer Veränderungen. Grundlage des Promotionsindex dagegen ist deren Volumen im Verhältnis zum Volumen in der Kontrollgruppe. So wurde für 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) ein extrem hoher, für AAF dagegen ein niedriger Promotionsindex ermittelt. Noch geringer war der Index für das häufig verwendete PB.

2.3.3. Einsatz und Wirkung bestimmter Promotoren

Während bei der Beurteilung der Rolle der DNA-Schädigung für die Initiation weitgehende Übereinstimmung herrscht, differieren die Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus von Promotoren erheblich. So werden bei TCDD rezeptorvermittelte Mechanismen in Erwägung gezogen. Wie bereits angeklungen, machen FARBER und Mitarbeiter (1976) die akut-toxische Wirkung des AAF, für den Promotoreffekt verantwortlich. Neuere Untersuchungen ziehen das in Zweifel (SAETER et al. 1988). PB dagegen wirkt als Induktor für Cytochrom P-450 und die Glutathion-S-Transferasen (SCHULTE-HERMANN et al. 1984 , JENSSON et al. 1985 , PIKE 1985). Die Vorteile von PB gegenüber vergleichbaren Promotoren untersuchten PERAINO und Mitarbeiter (1975). Die promovierende Wirkung steigt mit der Einwirkdauer an, wohingegen das Intervall zwischen initiierender Behandlung und Einsetzen des Promotors, weniger von Bedeutung ist (PERAINO et al. 1973 , PERAINO et al. 1977). Bei einem Versuch mit Hepatektomie und variierender PB-Applikation konnte die Beständigkeit pathohistologischer Veränderungen auch nach Absetzen des PB gezeigt werden. Dagegen ließ sich die Wirkung durch Erhöhung der Dosis oder Verlängerung der Behandlung nicht über einen bestimmten Wert steigern. So konnte in einem Fall, über einen Behandlungszeitraum von drei Monaten hinaus, mit PB keine Erhöhung der Tumorrates mehr erzielt werden (GOLDSWORTHY et al. 1984).

2.4. Die Patho-Histologie bei der Entstehung von Lebertumoren

2.4.1. Morphologische Beurteilungskriterien

Bei der Testung von Stoffen auf krebserzeugende Wirkung an der Leber wird normalerweise die Entstehung von Hepatomen und Hepatokarzinomen als Endpunkt für die Bewertung verwendet. Entsprechend lange sind die Zeitspannen zwischen Behandlung und Auswertung. Darum wurde nicht nur versucht, durch Promotoren diese Latenzperiode zu verkürzen, sondern auch früher auftretende patho-histologische Veränderungen zur quantitativen Auswertung heranzuziehen.

In der Hepatokanzerogenese unterscheidet man zellveränderte Herde, neoplastische Knoten und Hepatokarzinome als drei wesentliche Stufen (SQUIRE und LEVITT 1975), wobei die Grenzen dieser pathologische Einteilung von den Untersuchern verschieden interpretiert werden.

Herde stellen dichte Aggregationen von Zellen dar, die kleiner als ein Leberläppchen sind, nur durch ihre deutlich veränderte Zellmorphologie auffallen und Lage und Aufbau des umliegenden Gewebes wenig oder gar nicht beeinflussen.

Neoplastische Knoten sind umschriebene Läsionen, die mehr als ein Leberläppchen umfassen, keine normale Leberarchitektur mehr zeigen, zum Teil durch Zell- und Kernpolymorphie gekennzeichnet sind und das umliegende Normalgewebe komprimieren.

Als Hepatokarzinome bezeichnet man zytologisch maligne und invasiv wachsende Tumoren mit unterschiedlicher Differenzierung (drei Malignitätsgrade).

Weiterhin treten häufig eine Cholangiofibromatose oder einzelne Cholangiofibrome auf, die aus Gallengangsproliferaten mit begleitendem bindegewebigem Stroma, bestehen. Eine ähnliche Einteilung pathologischer Stufen der Hepatokanzerogenese findet sich auch bei anderen Autoren (WILLIAMS 1980 , SCHERER 1984).

In solchen zellveränderten Herden und in neoplastischen Knoten können verschiedene Zelltypen gefunden werden. Früheste morphologische Veränderungen sind klarzellige und eosinophile Herde. Erstere entstehen durch vermehrte Glykogeneinlagerung und Reduktion des endoplasmatischen Reticulums, letztere durch Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Reticulums (BANNASCH 1976). Fortgeschrittenere Stadien sind gekennzeichnet durch plurivakuolär verfettete Zellen und vor allem durch basophile Herde, die auch als "Carcinoma in situ" bezeichnet werden. Ebenso können intermediäre Zelltypen und gemischte Herde vorkommen, die mehrere morphologische Eigenheiten zeigen.

2.4.2. Enzymatische Marker der Hepatokanzerogenese

Lebergewebe zeigt im Verlauf der Kanzerogenese verschiedene herdförmige Enzymabweichungen (GÖSSNER und FRIEDRICH-FRESKA 1964; SCHERER und EMMELOT 1975). Sie sind in der Regel die am frühesten nachweisbaren Veränderungen. Entweder fehlen bestimmte Enzyme, wie Adenosintriphosphatase (ATPase), (BÖRNER und GÖSSNER 1968) oder Glukose-6-Phosphatase (G-6-Pase), (GÖSSNER und FRIEDRICH-FRESKA 1964), oder sie sind vermehrt exprimiert, wie gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT), (KALENGAYI und DESMET 1975). Stellt man diese Enzymatypen färberisch dar,

erleichtert dies die quantitative Auswertung, da auch kleine Veränderungen sicher als Herd angesprochen werden können. Einige Autoren bevorzugen die Darstellung der ATPase (EMMELOT und SCHERER 1980), oder der Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels (ENNZMANN und BANNASCH 1988). WILLIAMS (1976) benutzt die verminderte Eisenspeicherung in zellveränderten Herden.

In vielen Arbeitsgruppen gilt eine Erhöhung der GGT-Aktivität in den fokalen Läsionen als aussagefähigster Marker (PITOT et al. 1985). Biochemische Eigenschaften und patho-physiologische Bedeutung dieses Enzyms sind weitgehend geklärt (HANIGAN und PITOT 1985). Seit Beginn der Achtziger Jahre ist ein weiteres Enzym aus dem für den Metabolismus von Fremdstoffen so wichtigen Glutathionstoffwechsel als Marker bekannt geworden. Es ist das plazentare Isoenzym der Glutathion-S-Transferase (GST-P), das in der nicht veränderten Leber der Ratte so gut wie nicht exprimiert ist und in einem immunhistochemischen Verfahren dargestellt werden kann (SATO et al. 1984).

2.4.3. Die plazentare Glutathion-S-Transferase

TATEMATSU und Mitarbeiter (1985) konnten die Vorteile der immunhistochemischen Anfärbung von GST-P gegenüber der Darstellung von GGT in einer Versuchsanordnung an männlichen Fischer-ratten (F 344) zeigen. In diesem Versuch waren nahezu alle GGT-positiven Herde ebenfalls GST-P- positiv. Es wurden sogar 5 bis 10 % mehr Herde ermittelt und periportale Effekte, wie sie bei GGT oft auftreten, waren praktisch nicht vorhanden. Später konnte gezeigt werden, daß Karzinome, die im Verlauf ihrer Entstehung zum Teil wieder GGT-negativ wurden, immer noch zu 100 %

GST-P exprimierten (TATEMATSU et al. 1988 a). MOORE und Mitarbeiter (1987) fanden, daß bereits 48 Stunden nach Kanzerogenapplikation einzelne, GST-P-positive Hepatozyten auftraten, die sie als initiiert betrachteten. Die GST-P wird auch zur Darstellung von Neoplasien des Menschen verwendet (KODATE et al. 1986). Außerdem deuten Ergebnisse am Syrischen Hamster eine tierartüberschreitende Anwendbarkeit dieses Markerenzym an (MOORE et al. 1985). Ein weiterer Vorteil der GST-P ist, neben ihrer stabilen phänotypischen Expression in fokalen Läsionen, ihre gute Identifizierbarkeit selbst bei kleinsten Herden. In einem Versuch mit dem Solt-Farber-Modell, mit immunhistologischer Auswertung mehrerer Enzymparameter, war in einem Zeitraum von 20 Wochen festzustellen, daß die GST-P-Anfärbbarkeit wesentlich langsamer verlörend, als dies bei G6PDH oder GGT der Fall war (MOORE 1986). Ebenso war in kleineren Herden, von weniger als fünf Zellen Durchmesser, GST-P das am deutlichsten erkennbare Markerenzym. Ein reziproker Zusammenhang zwischen dem Entstehen GST-P-positiver Läsionen und dem Wachstum umgebender Leberzellen konnte in einem weiteren Initiations-Promotions-Ansatz gezeigt werden (TATEMATSU et al. 1988 b). Die Enzymbiochemie der GST-Familie wurde bereits ausführlich dargestellt (HABIG und JAKOBY 1981 , MANNERVIK und GUTHENBERG 1981 , SIMONS und VANDER JAGT 1981). Das spezifische Auftreten der GST-P in der Hepatokanzerogenese und ihre immunologische Verschiedenheit von anderen Vertretern der GST-Gruppe wurde untersucht (KITAHARA et al. 1984). Ihre Nukleinsäuresequenz ist bekannt (SUGUKA et al. 1985). In zahlreichen Initiations-Promotions-Anordnungen, auch unter Verwendung von PB, hat sich die immunhistochemische Darstellung der GST-P in qualitativer und quantitativer Hinsicht als über-

legen erwiesen. Für bestimmte seltener eingesetzte Promotoren, die die Peroxisomenaktivität stimulieren, fand man aber weniger Läsionen als bei G6Pase- oder ATPase-Anfärbung (HENDRICH et al. 1987). Die beiden zuletzt erwähnten Marker, die am Nativgefrierschnitt durchgeführt werden, liefern hier bessere Ergebnisse. Es wird auch als Nachteil der GST-P-Technik angesehen, daß sie meist am fixierten, paraffineingebetteten Gewebe durchgeführt wird, und somit bestimmte Läsionen nicht unmittelbar mit anderen Markern verglichen werden können (PITOT und CAMPBELL 1987).

2.5. Synergismus mehrerer Kanzerogene

DRUCKREY und KÜPFMÜLLER (1948) beobachteten die summative Wirkung mehrerer Dosen eines Kanzerogens. Dabei wurde die Wirkung einer krebserregenden Substanz als Funktion aus Dosis, Zeitdauer und einer stoffabhängigen Konstante formuliert ($c \cdot t^n = \text{konst.}$). Wenn sich aber die Wirkung mehrerer Dosen der gleichen Substanz addiert und die Schädigung der DNA ein grundlegendes Prinzip bei der Kanzerogenese ist, sollten sich auch die Effekte verschiedener Kanzerogene addieren können. Zu dieser Frage der "Syncarcinogenese" (BAUER 1963) gibt es vergleichsweise wenige Untersuchungen. Als wichtige Voraussetzung für ein Zusammenwirken wird die gleiche Organotropie bestimmter krebserregender Stoffe angesehen. Für DEN beispielsweise ist das Zielorgan bei fast allen untersuchten Vertebraten die Leber (SCHMÄHL und OSSWALD 1967). Synergistische Wirkungen wurden

praktisch nur bei solchen chemischen Kanzerogenen gefunden, die die gleiche Organotropie aufwiesen (SCHMÄHL 1976). So wurden mit subkanzerogenen Dosen von 4-Dimethylaminoazobenzol und DEN bei verkürzter Induktionszeit bei Ratten Leberkrebs erzeugt (SCHMÄHL et al. 1963). Dagegen wurde bei Verwendung von trans-4-Dimethylaminostilben und DEN, also Substanzen mit unterschiedlicher Organotropie, kein Synergismus gefunden (SCHMÄHL und THOMAS 1965). ODASHIMA (1960, 1962) untersuchte die kombinierte Wirkung von trans-4-Dimethylaminostilben und 4-Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb) an Ratten und konnte erstaunlicherweise mit Dimethylaminostilben bei 8 % der Tiere Lebertumoren erzeugen, wenn er zuvor über mehrere Wochen das Buttergelb verabfolgt hatte. Ebenfalls synergistische Wirkungen hatten NAKAHARA und FUKUOKA (1960) mit 4-Nitrochinolin-N-oxid und Methylcholanthren an der Mäusehaut beobachtet.

Bei den meisten der bisher beschriebenen Initiations-Promotions-Protokolle, bei denen der Effekt eines Initiators durch promovierende Maßnahmen unterstützt wird, handelt es sich um einen besonderen Fall von Synergismus. Wenn es sich bei der als Promotor eingesetzten Substanz, wie im Falle des AAF (TATEMATSU et al. 1977) um ein komplettes Kanzerogen handelt, sind die zusätzlichen initiiierenden Effekte dieses Stoffes schwer zu beurteilen. Das Ergebnis könnte auch als das Resultat zweier sequentieller Initiationen interpretiert werden (POTTER 1984). Seit neben der Organotropie vieler Substanzen auch Erkenntnisse über ihre initiiierenden und promovierenden Eigenschaften (vgl. 2.3.2.) zur Verfügung stehen, sind spezifi-

schere Untersuchungen über Synergismen möglich. Ein weiterer Ansatz synergistische Wirkungen zu studieren, waren Versuche, bei denen nach Initiation mit DEN (10 mg/kg) und Promotionsbehandlung, ein weiterer Initiator, nämlich Äthylnitrosoharnstoff, gegeben wurde. Dadurch wurden basophile Herde innerhalb anderer fokaler Läsionen erzeugt (SCHERER und EMMELOT 1984). Versuche mit zwei reinen Initiationssequenzen, d. h. einmaliger oder doch wenigstens angenähert punktueller Gabe initiierend wirkender Substanzen sind relativ selten. Untersuchungen über synergistische Wirkungen auf der Ebene der Initiation entsprechen aber durchaus der realen Situation. Menschen sind privat und beruflich einer Vielzahl von chemischen Kanzerogenen ausgesetzt, so daß eine Risikobeurteilung sich nicht nur auf einzelne Substanzen beziehen sollte.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Verwendete Substanzen

AAF und Propandiol wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, das Phenobarbital von der Fa. Serva, Heidelberg bezogen. AAS wurde im Institut für Toxikologie der Universität Würzburg hergestellt (METZLER und NEUMANN 1971). Beide Kanzerogene wurden umkristallisiert und auf einer Dünnschichtchromatographie-Fertigplatte (Kieselgel 60, F 254, Fa. Merck, Darmstadt) im Fließmittel Aceton, Benzol, n-Hexan (30: 7: 17) auf Reinheit geprüft. Zur Fütterung der neugeborenen Ratten wurde handelsübliche Dosenmilch der Marke Glücksklee, 7,5 % Fett verwendet.

3.2. Versuchstiere

40 weibliche Wistar Albinoratten (Gewicht ca. 180 - 200 g), sowie 12 trächtige Muttertiere wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde, Hannover bezogen.

Alle Tiere wurden in Makrolonkäfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, bei stets freiem Zugang zu Trinkwasser und Ad-Libitum-Fütterung gehalten. Es wurde Altromin 1324, Standarddiät für Ratten und Mäuse, der Fa. Altrogge, Lage verwendet.

Die für die Hepatektomie vorgesehenen Tiere wurden zunächst in Gruppen von je vier Tieren pro Käfig gehalten, nach erfolgter Operation zu zwei bis drei Tieren pro Käfig umgesetzt. Die einzeln eingesetzten Muttertiere warfen ein bis drei, spätestens

jedoch sechs Tage, nach Anlieferung. Die Wurfstärken betrugen drei bis zehn Jungtiere. Auf Randomisierung wurde verzichtet, dafür wurden, nachdem die Neugeborenen individuell und eindeutig identifizierbar markiert waren, innerhalb eines Wurfes mehrere verschiedene Behandlungsgruppen eingerichtet.

3.3. Versuchsanordnung

Für den Versuch mit erwachsenen Tieren wurden 40 Weibchen eingesetzt, wobei die letztlich verbleibenden Gruppen, bedingt durch prae- und postoperative Ausfälle, eine Stärke von sechs bzw. fünf Tieren aufwiesen.

Mit Hilfe einer Magensonde wurden die jeweiligen Substanzen der ersten Serie in vier Einzeldosen zu je einem Viertel der Gesamtdosis intragastral verabfolgt (Abb.1). Die Applikation erfolgte dabei an den Tagen 1, 4, 7, 10 jeweils um 7.00 Uhr. Nach einer Pause von fünf Tagen wurde die zweite Substanz analog zur ersten Serie in vier Dosen gegeben. Neben einer reinen Lösungsmittelkontrollgruppe, wurden zwei Kombinationsgruppen gebildet, bei denen zuerst AAS und dann AAF (AAS-AAF) oder zuerst AAF und darauf AAS (AAF-AAS) verabfolgt wurde. Zwei weitere Gruppen erhielten in beiden Applikationsserien die gleiche Substanz, also AAS-AAS und AAF-AAF.

Am Tag 28 wurden die Ratten einer Zweidrittelhepatektomie unterzogen. Als Promotor erhielten sie ab Tag 35 Phenobarbital (PB) in einer Konzentration von 250 ppm mit dem Trinkwasser (vgl. Abb. 3). Aus jeder Behandlungsgruppe wurden 13 Wochen nach Beginn der Promotorbehandlung zwei Tiere entnommen, ge-

tötet und die Lebern zur histologischen Untersuchung asserviert. Die verbliebenen Ratten wurden 26 Wochen nach Beginn der Promotionsbehandlung zur Auswertung aus dem Versuch genommen.

Die neugeborenen Tiere wurden als Wurf beieinander gelassen, so daß sich die fünf Applikationsgruppen auf zwölf Würfe mit drei bis zehn Jungtieren verteilten.

Verabfolgt wurden die Kanzerogene, in Kondensmilch gelöst, mit Hilfe einer Eppendorfpipettenspitze, unter Auslösung des Saugreflexes. Am Tag 6 und 8 nach der Geburt gab man die vorgesehene Dosis einer Serie je zur Hälfte. Auf eine Pause von vier Tagen, folgte die Verabreichung zweier weiterer Halbdosen der vorgesehenen zweiten Substanz an Tag 12 und 14. Da bei den meisten Würfen eine Sägezeit am frühen Nachmittag zu beobachten war, erfolgte die Substanzfütterung um 14.00 Uhr.

Dieser Versuchsansatz beinhaltete eine Lösungsmittelkontrollgruppe, eine AAS-AAF-Gruppe, zwei Reinsubstanzgruppen AAS-AAS und AAF-AAF, sowie eine "Simultangruppe" (AAF/AAS), in der beide Kanzerogene im Gemisch in vier Vierteldosen der Gesamtdosis, entsprechend verfüttert wurden (vgl. Abb. 2). 26 bis 28 Tage post natum wurden die Jungtiere, nach Geschlechtern getrennt, abgesetzt und von da an zu je zwei bis drei Tieren (Männchen) bzw. zu zwei bis vier Tieren (Weibchen) in Makrolonkäfigen gehalten. Von diesem Zeitpunkt an erhielten sie PB über das Trinkwasser in einer Dosierung von 500 ppm zugeführt. 10 Wochen bzw. 20 Wochen nach dem Absetzen wurden je drei Männchen und zwei Weibchen aus dem Versuch genommen (vgl. Abb. 3).

20 überzählige Tiere verblieben in einer Nachbeobachtungsgruppe, deren Auswertung nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit ist. An

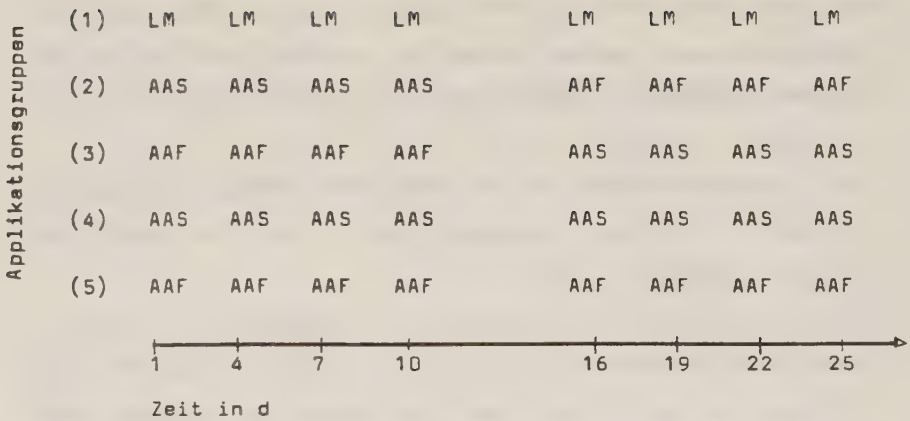


Abb.1: Schematische Darstellung der Initialbehandlung im Versuch mit erwachsenen Wistar Ratten. Pro Serie, bestehend aus vier Einzelapplikationen, wurden 80 $\mu\text{mol/kg}$ AAS und 400 $\mu\text{mol/kg}$ AAF verabfolgt.

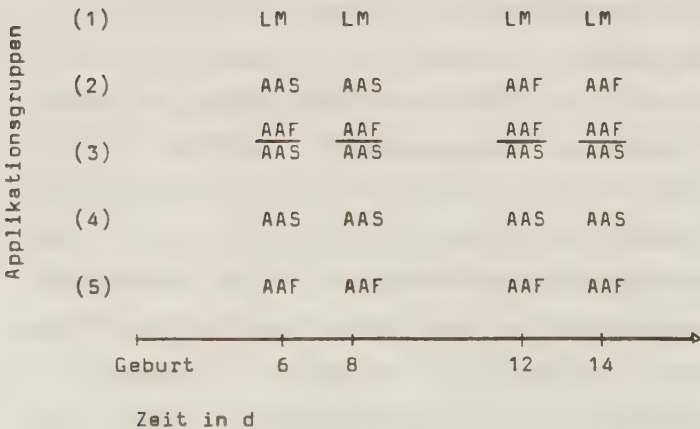


Abb.2: Schema der Initialbehandlung im Versuch mit neugeborenen Wistar Ratten. Mit Ausnahme von AAF/AAS (vgl. 3.4) wurden pro Serie (zwei Einzelapplikationen) 100 $\mu\text{mol/kg}$ AAS und 250 $\mu\text{mol/kg}$ AAF verabfolgt.

ihnen soll verfolgt werden, ob und mit welcher Inzidenz die durchgeführte Behandlung innerhalb der natürlichen Lebensdauer tatsächlich zu Lebertumoren führt.

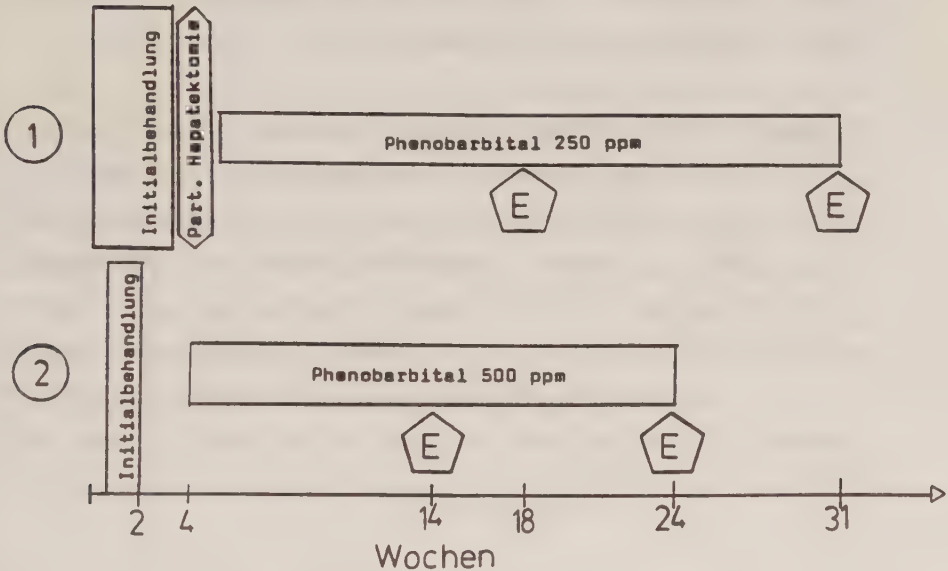


Abb.3: Vergleichende Darstellung beider Versuchsansätze.

(1) Versuch mit erwachsenen Ratten und Teilhepatektomie

(2) Versuch mit neugeborenen Ratten

E Euthanasie und Entnahme der Lebern zur histologischen Untersuchung

3.4. Dosierungen

Die von Kuchlbauer beschriebene Dosierung wurde für die erwachsenen Tiere beibehalten (KUCHLBAUER 1985). Die Gesamtdosis von 80 $\mu\text{mol/kg KG}$ einer AAS-Serie wurde, auf vier Dosen ver-

teilt, als 0,02 molare Lösung appliziert, wobei jedes Tier pro Sondierung 1 ml/kg KG erhielt. Die AAS-AAS-Gruppe bekam nach Ablauf der Pause erneut 80 $\mu\text{mol/kg}$ in vier Einzeldosen.

Die Gesamtdosis von 400 $\mu\text{mol/kg}$ KG AAF wurde entsprechend in vier Dosen von 1 ml/kg einer 0,1 molaren Lösung verabfolgt. Für die AAF-AAF-Gruppe gilt das oben ausgeführte analog. Die Kontrollgruppe erhielt reines Propandiol.

Als Dosis für die Neugeborenen wurden bei AAS 100 μmol und bei AAF 250 $\mu\text{mol/kg}$ KG gewählt. Diese Menge wurde auf zwei, im Falle der Simultangruppe AAF/AAS auf vier Fütterungen verteilt (vgl. Abb. 2). Beide Kanzerogene wurden in Kondensmilch (7,5 % Fettgehalt) gelöst und als 0,025 molare bzw. 0.0625 molare Lösung verabfolgt, so daß jedes Tier bei einer Fütterung 2 $\mu\text{l/g}$ KG aufnahm. Die Reinsubstanzgruppen AAS-AAS und AAF-AAF bekamen 200 $\mu\text{mol/kg}$ bzw. 500 $\mu\text{mol/kg}$, die Kontrollgruppe erhielt reine Dosenmilch.

3.5. Partielle Hepatektomie

Am Tag 28 wurden die erwachsenen Weibchen des ersten Versuches einer Zweidrittelhepatektomie unterzogen. Die Ratten wurden in einem Exsikkatorgefäß mit Äther bis zum Eintritt des Toleranzstadiums anaesthetisiert und mit einem Glasröhrchen, in dem sich ein mit Äther getränkter Wattebausch befand, in operationsfähigem Zustand gehalten. Durch dichteres bzw. weniger dichtes Verlagern des Röhrchens an die Nase, war die Narkose gut steuerbar.

Nach Rasur und Desinfektion der Regio hypochondriaca wurde die Bauchdecke in Höhe der Linea alba etwa vier Zentimeter weit durchtrennt und die Bauchhöhle eröffnet. Mit einer anatomischen Pinzette wurden nun die miteinander verwachsenen Lobi hepatici sinister accessorius und dexter accessorius erfaßt, ca. fünf Millimeter distal der Mündung der Vena hepatica mit Dexon (2/0) ligiert und mit einem Scherenschlag abgesetzt. In ähnlicher Weise wurde der Lobus hepaticus sinister entfernt. Peritoneum und Fascia transversa wurden hierauf mit atraumatischem Catgut (3/0) mit runder Nadel fortlaufend in einer Kürschnernaht verschlossen. Ebenso verfuhr man mit der äußeren Haut. Nach der Operation traten in zwei Fällen partielle Nahtdehiscenzen der äußeren Hautnaht auf, die aber über Bildung von Granulationsgewebe problemlos verheilten.

3.6. Untersuchung und Gewichtsbeobachtung

Die erwachsenen Tiere des Versuchsansatzes mit partieller Hepatektomie wurden anfangs, vor jeder Substanzgabe, zur Bestimmung der Dosis, nach der Operation in einwöchigem Abstand gewogen und einer kurzen Untersuchung unterzogen. Geachtet wurde dabei auf Änderungen des Allgemeinbefindens, Haarausfall, sicht- oder palpierbare Umfangsvermehrungen und Augenausfluß. Veränderungen wurden aufgezeichnet.

Bis zum Absetzen von der Mutter wurden die Neugeborenen ab dem fünften Tag alle zwei Tage gewogen, später wurde das Körpergewicht einmal pro Woche bestimmt. Eine kurze Allgemeinuntersuchung erfolgte ähnlich der oben beschriebenen.

3.7. Gewinnung und Asservierung der Gewebe

Am Ende der bezeichneten Versuchsabschnitte, wurden die zur Entnahme vorgesehenen Tiere mit Äther betäubt und durch atlanto-occipitale Dislokation getötet. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurde die Leber dargestellt, freipräpariert, gewogen und makroskopisch beurteilt. Von jedem der fünf Hauptleberlappen wurden jeweils zwei Scheiben von annähernd 7 mm Dicke entnommen, von diesen wiederum eine in Formalin (3,7 %) fixiert und in Paraffin eingebettet, die andere in " Tissue-Tek " (O.C.T.4583) der Fa. Ames Divisions, Elkhart, Indiana eingelegt und tiefgefroren. Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebe wurden danach bei minus 70 Grad Celsius aufbewahrt.

Nach Gewinnung der Leberproben wurde der Resttierkörper makroskopisch untersucht. Neben den Organen aus Bauch-, Brust- und Beckenhöhle wurden auch Milchleiste und Regio periauricularis auf Veränderungen überprüft.

3.8. Herstellung der histologischen Schnitte

Von den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebsblöcken wurden mehrere Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Mit dem Kryostaten wurden von jedem Gefrierblock mehrere, ca. 5 µm dicke Schnitte gewonnen und auf Objektträger aufgezogen. Die zur GGT-Färbung vorgesehenen Präparate wurden, nach kurzer Trocknung, 90 min im Färbemedium, bestehend aus 5 mg l-Glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamid (Fa. Bachem, Bubendorf - Schweiz) in

0,25 ml N,N-Dimethylformamid, 10 ml Kakodylatpuffer (pH 7,0), 10 mg Fast Blue BB Salt und 5 bis 10 mg Glycylglycin, inkubiert. Nach Spülen mit Leitungswasser und Aqua dest., wurden die Präparate in Formaldehyd (3,7 %) gestellt, um übermäßige Blasenbildung zu vermeiden. Schließlich wurden die Schnitte erneut gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

Zur Darstellung GST-P-positiver Herde wurden Gefrierschnitte zunächst eine Stunde bei ca. +18° C luftgetrocknet und dann bei +4° C etwa 24 h aufbewahrt. Die Präparate wurden 10 min lang in Aceton fixiert, darauf 15 Minuten getrocknet und dreimal jeweils 10 min in Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Die Gewebsschnitte wurden sodann mit Anti-GST Yp (MED 23 Yp) der Fa. MedLabs, Dublin, in einer Verdünnung von 1 : 200, 30 min lang inkubiert. Einem erneuten Spülgang mit Tris-NaCl-Puffer folgte die Zugabe des Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Ziege Anti Kanin IgG h+L, Fa. Medac, Hamburg) in einer Verdünnung von 1 : 50 . Nach 30 min wurde mit Tris-Puffer (pH 7,6) gespült. Zur Anfärbung wurden die Schnitte mit einer Lösung, die aus 10 ml Tris-Puffer (pH 7,6), 6 mg DAB (3,3-Diaminobenzidintetra-hydrochlorid krist.) und 5 µl H₂O₂ bestand, überschichtet. 10 min später wurde erneut mit Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) und Aqua dest. gespült. Hämalaungegenfärbung, Spülen und Eindecken in Glyceringelatine bildeten den Abschluß der Behandlung.

3.9. Histologische und morphometrische Auswertung

Die morphometrische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop mit Objektführung (Laborlux K, Fa. Leitz, Wetzlar) bei 100-facher Vergrößerung (Objekt 10x, Okular 10x) durch ein Quadratzählverfahren. Eingesetzt wurde ein definiertes Okularzählnetz (Meßokular 519 750, Fa. Leitz, Wetzlar; Seitenlänge bei 100-facher Vergrößerung 1mm) mit quadratischem Muster (100 Quadrate, Seitenlänge eines Quadrats 0,1 mm). Mit dem Okularzählnetz wurde jeweils ein Gewebeschnitt flächendeckend unter Verwendung der Objektführung ausgewertet. Gezählt wurde die Anzahl der Quadrate, die das gesamte Leberparenchym bedeckten, und die Anzahl der Quadrate, die auf definierte, bei den jeweiligen Färbemethoden erkennbare Herde fielen. Dabei wurden pro Tier und Färbemethode fünf Schnitte mit einer Fläche von je 0,3 bis 1,2 cm² ausgewertet. Die gesamte Fläche pro Tier und Färbemethode betrug etwa 4 cm² entsprechend 40.000 gezählten Einzelquadraten. Neben der Anzahl der Läsionen pro Flächeneinheit (n/cm²) und der durchschnittlichen Herdgröße (mm²), wurde auch der Anteil der veränderten Fläche (Herdflächenanteil ; HFA in %) als Summe der tatsächlich gemessenen Herdflächen in Relation zur Gesamtschnittfläche bestimmt. Die kleinste flächendeckend ermittelbare Größe betrug 0,01 mm² entsprechend etwa 8 Hepatozyten.

Darüberhinaus wurden die H.E.-Schnitte in verschiedenen Vergrößerungsstufen auf das Vorkommen anderer patho-histologischer Veränderungen untersucht.

3.10. Statistik

Den Angaben in den Tabellen liegen Gruppenstärken von zwei oder drei Tieren zugrunde. Für $n = 2$ wurden die Einzelwerte angeführt, bei $n = 3$ wurden Durchschnittswerte und der Standardfehler ($SE = s:\sqrt{n}$) angegeben. Dabei wurde die statistische Problematik einer solchen Verfahrensweise bei kleinen Gruppen durchaus gesehen. Sie wurde aber aus Gründen der Übersichtlichkeit einer rein deskriptiven Darstellung der Werte vorgezogen. Grundlage für die Auswertung waren fünf Schnitte, entsprechend ca. 4 cm^2 Gewebsfläche, die pro Tier und Anfärbemethode ausgezählt wurden. In den Gruppen, die wenige große Herde pro Flächeneinheit entwickeln, spielt der Zufall beim Legen der Schnittebene eine Rolle. So können die Herde zentral oder tangential getroffen, oder auch völlig verfehlt werden. Der sich daraus womöglich ergebende methodische Fehler soll hier vernachlässigt werden. Eigene Erfahrungen und Ergebnisse anderer Mitarbeiter des Arbeitskreises (KRESS - persönliche Mitteilung) deuten darauf hin, daß mit der beschriebenen Methode für ein einzelnes Tier zuverlässige Resultate gewonnen werden können. Eine Verdopplung der Anzahl ausgewerteter Schnitte erbringt jedenfalls keine wesentliche Veränderung der Ergebnisse. Aufgrund der sehr kleinen Tierzahlen, ist auch die Prüfung von Unterschieden zwischen den Applikationsgruppen auf Signifikanz kritisch zu sehen. Ihre Beweiskraft ist bei entsprechend wenigen Freiheitsgraden gering. Dennoch wurden Signifikanzprüfungen mit dem Student-t-Test durchgeführt, wobei signifikant ($p \leq 0,01$) und schwach signifikant ($p \leq 0,05$) unterschieden wurden. Damit wird beabsichtigt, für auffallende Ergebnisse der pathomorphologischen und toxikologischen Beur-

teilung des Versuches, durch Angabe von Irrtumswahrscheinlichkeiten eine vorsichtige quantitative Einordnung zu ermöglichen. Ein nach statistischen Kriterien sicherer Umfang an Werten wäre, im Hinblick auf die Fragestellung des Versuches, nach dem Tierschutzgesetz nur bedingt vertretbar.

4) ERGEBNISSE

4.1. Initiations-Promotions-Versuch mit erwachsenen Ratten

4.1.1. Beobachtung über den Zustand der Versuchstiere

4.1.1.1. Gewichtsentwicklung

Die Gewichtszunahme während der Behandlung mit den Kanzerogenen war bei den Gruppen, die zuerst AAF oder nur diese Substanz erhalten hatten, am geringsten. Gruppen die anfangs oder ausschließlich AAS erhalten hatten, lagen in der täglichen Zunahme näher bei der Kontrollgruppe. Die partielle Hepatektomie, nach vier Wochen führte in allen Gruppen zu einem deutlichen Gewichtsverlust. Dieser konnte später - wie die angenähert parallelen Gewichtsverläufe (Abb.4) zeigen - wieder ausgeglichen werden. Da die Tiere zum ersten Entnahmetermin, 13 Wochen nach Beginn der Promotionsbehandlung, zufällig ausgewählt wurden, sind spätere Gewichtsbeobachtungen infolge relativ kleiner Tierzahlen wenig aussagekräftig.

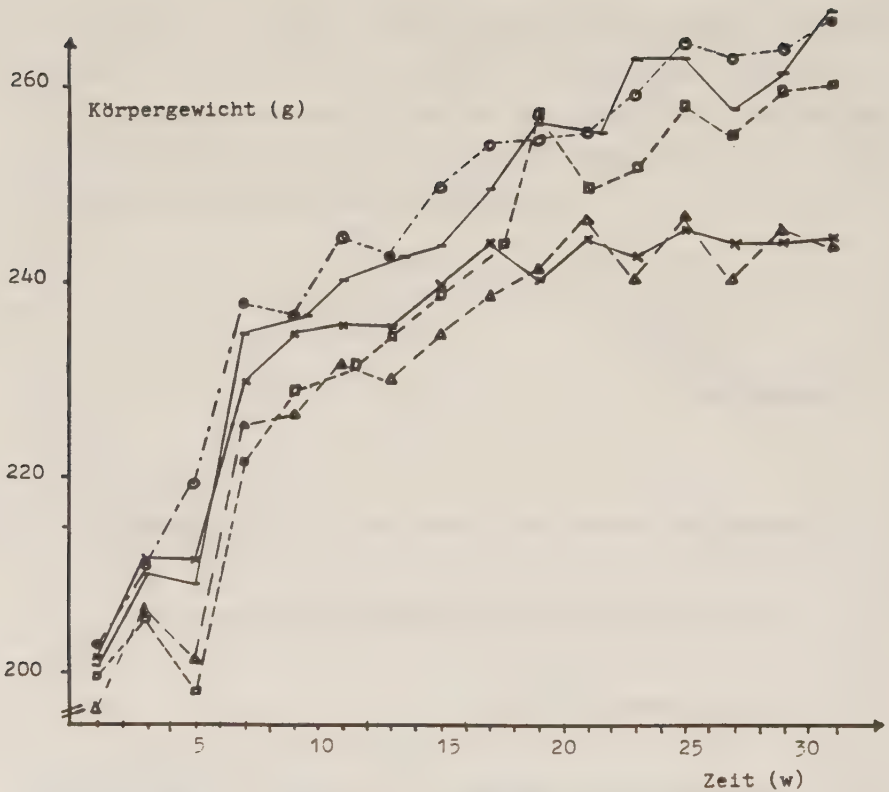


Abb.4: Gewichtsentwicklung aus dem Versuch mit erwachsenen Tieren (PH + PB). x Lösungsmittelkontrolle, o AAS-AAF, Δ AAF-AAS, □ AAS-AAS, — AAF-AAF ($\bar{x}$, n = 3-6).

4.1.1.2. Lebergewichte und Beobachtungen bei der Gewebsentnahme

Die Gewichte der Lebern differieren trotz unterschiedlicher Behandlung wenig. In Relation zum Körpergewicht (vgl. Tab. 1) können signifikante Unterschiede weder zwischen den einzelnen mit Kanzerogen behandelten Gruppen, noch zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Tab. 1: Lebergewichte der erwachsenen Ratten (PH + PB). Die Tabelle enthält bei 13 Wochen Werte von zwei Tieren paarweise gruppiert, die Prozentangabe bezieht sich hier auf das arithmetische Mittel. Bei 26 Wochen gilt $\bar{x} \pm SE$, n = 3.

Gruppen	Entnahmezeitpunkte			
	13 Wochen		26 Wochen	
	g	%KG	g	%KG
Lösungsmittel- kontrolle	10.0 7.9	3.5	9.6 ± 0.5	3.9
AAS-AAF	10.5 8.3	3.6	9 ± 1	3.7
AAF-AAS	10.3 9.5	4.2	8.6 ± 0.2	3.5
AAS-AAS	8.4 7.8	3.4	9.4 ± 0.5	3.6
AAF-AAF	8.8 8.6	3.5	10.9 ± 0.8	4.1

Mit Ausnahme eines Tieres (vgl. 4.1.1.3.) waren zu beiden Entnahmezeitpunkten nur geringe Spuren der Hepatektomie in Form vereinzelter narbiger Veränderungen an den resezierten Lappen zu finden. Alle Leberlappen waren in ihrer ursprünglichen Form und Verteilung zu erkennen, da es zu einer partiellen Regeneration der resezierten Lappen gekommen war. Die nicht resezierten waren - verglichen mit der Normalleber - relativ groß. Ohne gruppenspezifische Häufung trat wiederholt eine feine Läppchenzeichnung deutlich hervor. Einige Lebern der Tiere, die AAS oder nur AAS erhalten hatten, besaßen an der Oberfläche kleine, kavernöse, mit Blut gefüllte Hohlräume. Insgesamt wirkten diese Organe brüchiger. An den Lappenrändern waren deutlich erweiterte und stark blutgefüllte Gefäße sicht-

bar. Beim zweiten Entnahmezeitpunkt waren in den Gruppen AAS-AAF und AAF-AAF vereinzelt stecknadelkopfgroße, weiße bis gelbe Stippchen an der Organoberfläche zu sehen. Ein Tier der AAF-AAS-Gruppe hatte einen ca. 9 mm großen, kugeligen Lebertumor an einem der Processus papilliformes entwickelt. Zudem wurden bei diesem Tier gelblich verfärbte Nieren, ein stark erweitertes Nierenbecken, sowie Konkrementbildung in den harnableitenden Organen gefunden. Bei zwei Ratten der AAS-AAS-Gruppe ergab die abschließende Untersuchung des Tierkörpers, einmal linksseitig eine Ovarialzyste, zum andern beidseitig Eierstockszysten von je etwa 1,2 cm Durchmesser.

4.1.1.3. Gesundheitszustand der Versuchstiere

Bei der wöchentlichen Untersuchung wurde, von der 11. bis zur 21. Woche nach Beginn der Promotionsbehandlung, bei zwei Tieren der AAF-AAS-Gruppe Haarausfall im Nackenbereich beobachtet. Ein Tier der AAS-AAF-Gruppe zeigte, von der 8. bis 10. Woche der Promotionsphase, eine rückläufige Gewichtsentwicklung und einen deutlichen Ascites. Bei der späteren Entnahme der Leber wurden Verklebungen mit Zwerchfell, Netz und serösem Magenüberzug festgestellt. Zudem hatte sich die Leber nicht annähernd in ihrer ursprünglichen Form regeneriert, sondern war infolge der räumlichen Enge ihrer Verklebungstasche zu einem unregelmäßig-ovalen Gebilde gewachsen, an dem allein der Lobus dexter noch topographisch zugeordnet werden konnte. Wegen dieser Besonderheiten, wurde die Leber dieses Tieres, die natürlich trotzdem untersucht wurde, nicht in die Auswertung einbezogen.

4.1.2. Histologische Auswertung

4.1.2.1. Allgemeinzustand der Gewebe

Auch außerhalb herdförmiger Veränderungen zeigten die Leberzellen häufig eine Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Reticulums, ein zum Teil aufgehelltes Zytoplasma, eine Kernpolyploidisierung und vereinzelt sogar Mitosen. Diese Veränderungen, die als morphologisches Substrat einer Arbeitshyperplasie zu bewerten sind, waren zum ersten Entnahmezeitpunkt stärker ausgeprägt und fanden sich bevorzugt im Bereich der Zentralvenen und größerer Venenäste. Darüberhinaus wurden vereinzelte Zellnekrosen beobachtet. In den AAS-Gruppen fielen erweiterte Sinusoide auf, die zum zweiten Entnahmezeitpunkt mitunter einer Peliosis ähnelten. Ansätze zur Cholangiofibrombildung wurde in allen Gruppen gesehen, waren aber am markantesten in den AAS-Gruppen. Insgesamt wiesen die Gewebe außerhalb der fokalen Veränderungen, bei der zweiten Entnahme nach 26 Wochen, ein ruhigeres und gleichförmiges Zellbild auf.

4.1.2.2. Charakterisierung der fokalen Veränderungen

Die immunhistochemische Darstellung der GST-P-Herde mit der Immunoperoxidasetechnik (Abb.5) ergab scharfbegrenzte, mittel- bis dunkelbraun gefärbte, annähernd runde Zellenhaufen. Zudem sah man bisweilen "Microfoci", die aus wenigen Zellen bestanden, sowie einzelne positive Hepatozyten, die sowohl solitär, als auch in lockeren Aggregationen - ohne direkten Zellkontakt - vorkamen. In die Auswertung wurden jedoch nur solche Veränderungen einbezogen, die eindeutig fokalen Charak-

ter und quantifizierbare Größe (vgl. 3.9.) besaßen.

Die GGT-positiven Zellen waren durch intensive Rotmarkierung in der Nähe der Zytoplasmamembran, sowie durch feingranuliertes, orangerotes bis rötliches Zytoplasma gekennzeichnet. Die Herde (Abb.6) waren dicht gepackt und besaßen netzförmige Struktur, resultierend aus der ungleich stärkeren Anfärbung der Zellmembranen.

In der H.E.-Darstellung waren die meisten Herde eosinophil (BANNASCH 1976). Eine Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Reticulums bewirkte hier eine milchglasartige, schwache Eosinophilie in den perinucleären Bereichen und intensive, zum Teil lamellenartige Rötung in eher membranahnen Abschnitten der Zelle. Zum zweiten Entnahmezeitpunkt ließen die Schnitte vor allem in der AAS-AAS-Gruppe einige klarzellige Herde erkennen. Deutliche Verdrängung des umliegenden Gewebes, als Kriterium für neoplastische Knoten, charakterisierte einige größere Läsionen. Einige Knoten zeigten deutliche Zell- und Kernpolymorphie, sowie Mitosen (Abb.7). Die AAF-AAF-Gruppe wies zum späteren Entnahmeterrnin Zellherde mit starker Fettvakuolenbildung (Abb. 8) und intermediäre Herde (BANNASCH 1976) auf. Einige wenige Herde waren von kavernösen Gefäßausbuchtungen, ähnlich einer Peliosis (Abb.9), durchzogen. Zwei außergewöhnlich große Knoten wurden nach 26 Wochen gefunden (Abb.10). Einer der beiden, der zentral in einem Leberlappen lokalisiert war, nahm seinen Ursprung von einem periportalcn Feld (Abb.11), und breitete sich von da unter starker Verdrängung des Restgewebes radiär aus.

In einigen großen Herden der AAS-AAF-Gruppe und der AAS-AAS-Gruppe war nach 26 Wochen im Zentrum keine GGT-Anfärbung mehr

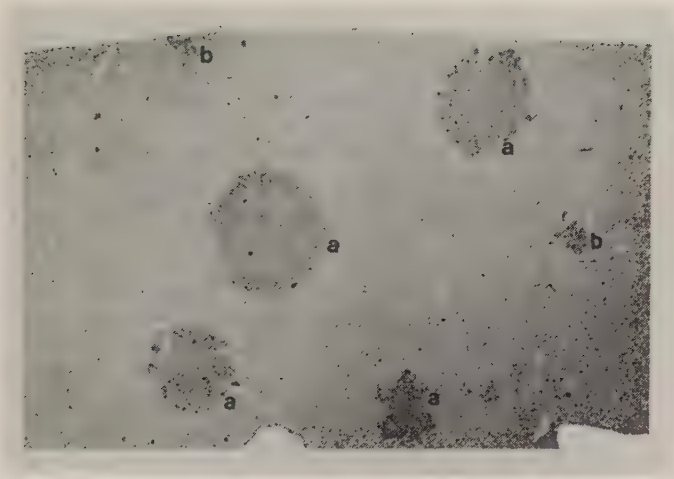


Abb.5 : Nativgefrierschnitt durch den Leberlappen eines Weibchens aus dem Versuch mit neugeborenen Ratten. Darstellung der GST-P mit Immunoperoxidasetechnik. Zu sehen sind vier große (a) und zwei kleine (b) Herde. (Vergrößerung: 2,5/1,25).

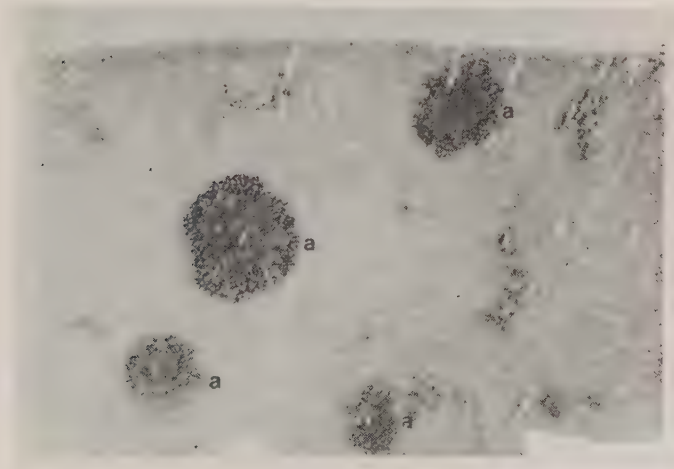


Abb.6 : Derselbe Gefrierblock wie in Abb.5 mit Darstellung der GGT. Nur die vier großen Herde (a) sind dargestellt, Gering- bis mittelgradige Anfärbung der Portalfelder ist zu sehen. (Vergr.: 2,5/1,25).

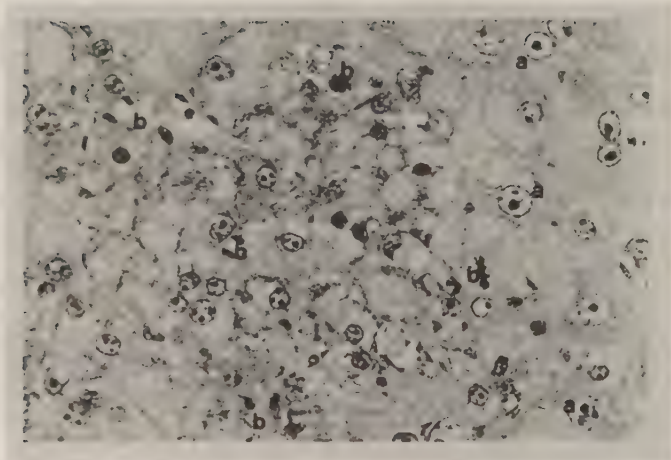


Abb.7 : H.E.-Schnitt eines neoplastischen Knotens. Deutliche Kern- und Zellgrößenschwankungen, prominente Nukleoli in vergrößerten Kernen (a) und mehrere Mitosen (b) sind zu sehen. (Vergr.: 6,9/1,6).

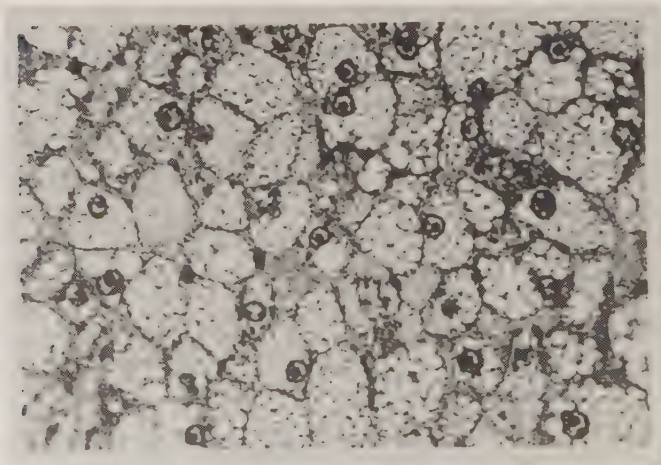


Abb. 8 : H.E.-Schnitt durch einen Herd eines AAF-AAF-Tieres nach 26 Wochen. Der Ausschnitt zeigt Zellen mit kleinvakuoliger Verfettung. (Vergr.: 10/1,25).

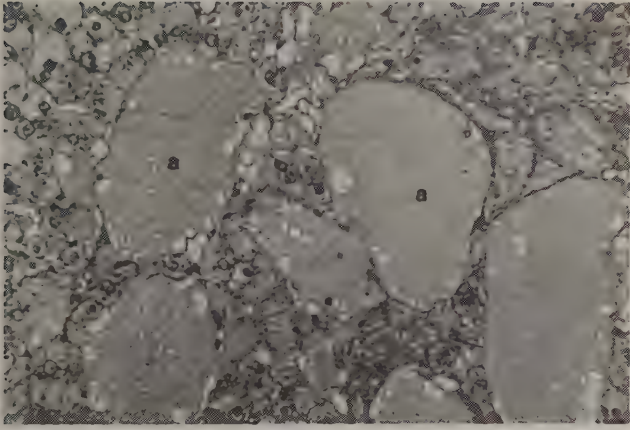


Abb.9: H.E.-Schnitt durch einen neoplastischen Knoten. Peliosis-
ähnliche Gefäßausbuchtungen (a) durchziehen den Herd.
(Vergr.: 16/1,25).



Abb.10: H.E.-Schnitt eines großen neoplastischen Knotens an
einem der Papillarfortsätze auf der Abdominalseite
der Leber. Der teils klarzellige, teils aus eosinophilen
Zellen bestehende Knoten ist deutlich vom Restgewebe
abgegrenzt (a). (Vergr.: 2,5/1,25).

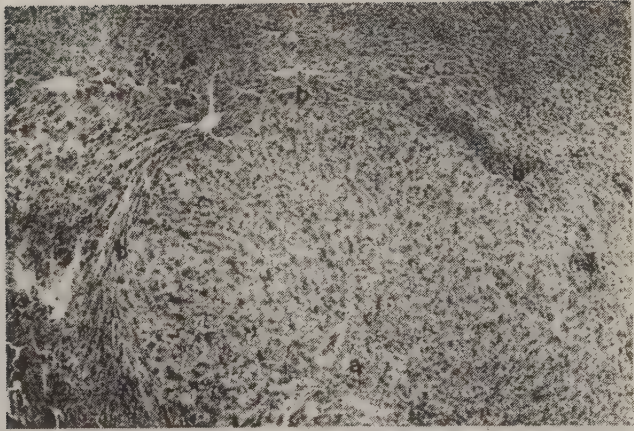


Abb. 11: H.E.-Schnitt durch einen neoplastischen Knoten mit Portalfeld (a) im Zentrum. Deutlich zu sehen ist die Knotendemarkierung durch eine Verdrängung des umgebenden Gewebes (b). (Vergr.: 10/1,25).

zu erzielen. Vergleichshalber angefertigte GST-P-Darstellungen waren im gesamten Herd homogen gefärbt.

4.1.2.3. Quantifizierung der herdförmigen Läsionen

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Aus dieser Tabelle werden im folgenden Daten unter bestimmten Gesichtspunkten zusammengestellt.

Tab.2 : Ergebnisse der Auswertung der Schnitte aus dem Versuch mit erwachsenen Ratten (PH+PB). Angegeben sind die Parameter HFA (%), Herdanzahl (n/cm²), und durchschnittliche Herdgröße (mm²). Zum ersten Entnahmezeitpunkt (13 Wo) standen je zwei Tiere pro Versuchsgruppe zur Verfügung. Für sie sind Einzelwerte angegeben. Für den zweiten Zeitpunkt gilt $\bar{x} \pm SE$, n = 3.

Gruppen	GGT		GST-P		H.E.	
	HFA (%)	n/cm ² Herdgr(mm ²)	HFA (%)	n/cm ² Herdgr(mm ²)	HFA (%)	n/cm ² Herdgr(mm ²)
13 Wochen	Kontrolle	0,04 0	0,4 0	0,01 0	0,01 0,02	0 0
	AAS-AAF	5,0 4,6	3,7 3,7	0,14 0,12	8,3 10,4	2,0 1,5
	AAF-AAS	6,0 4,5	12,3 9,3	0,05 0,05	7,1 6,5	0,09 0,06
	AAS-AAS	7,3 8,5	10,8 7,3	0,07 0,12	17,6 19,0	0,04 0,03
	AAF-AAF	5,5 4,7	3,8 3,2	0,15 0,15	8,3 9,9	2,5 2,7
26 Wochen	Kontrolle	0,08 ±0,06	0,2 ±0,2	0,02 ±0,02	0,01 ±0,01	0 0
	AAS-AAF	19 ±2	5,9 ±0,5	0,32 ±0,04	13 ±2	5,6 ±0,5
	AAF-AAS	11 ±4	11 ±2	0,09 ±0,02	21 ±8	4 ±1
	AAS-AAS	16 ±2	8 ±2	0,22 ±0,06	22 ±2	2,6 ±0,6
	AAF-AAF	5 ±2	4,0 ±0,6	0,13 ±0,05	10 ±4	12 ±3

Vergleich der verschiedenen Darstellungsmethoden:

Mit der anti GST-P-Färbung wurden durchweg mehr Herde gesehen als nach GGT-Färbung oder im H.E.-Schnitt (Abb.12).

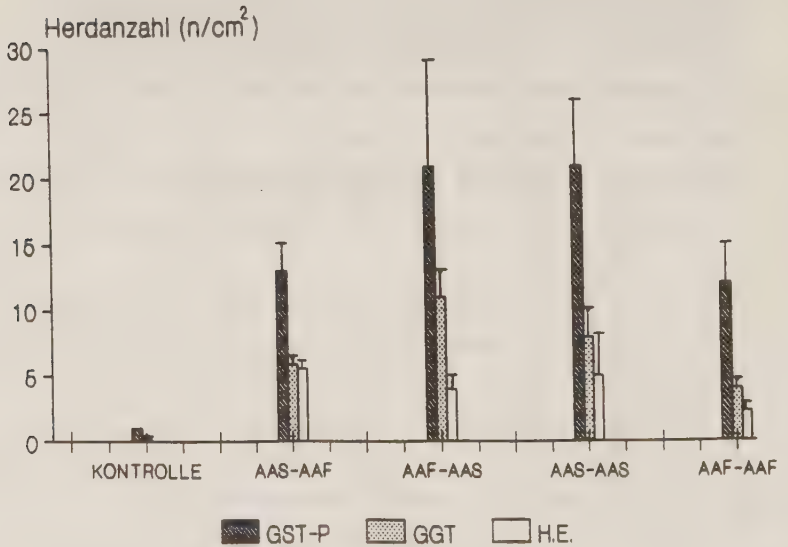


Abb.12: Vergleich der Herdzahl (n/cm²) nach unterschiedlich Darstellung (GST-P, GGT, H.E.) nach 26-wöchiger Promotion ($\bar{x} \pm SE$, n = 3 , erwachsene Ratten, PH + PE

Da bei der GST-P-Technik der relative Anteil kleiner Herde zunahm, war die durchschnittliche Herdgröße geringer als bei den anderen beiden Anfärbungen (Abb.13).

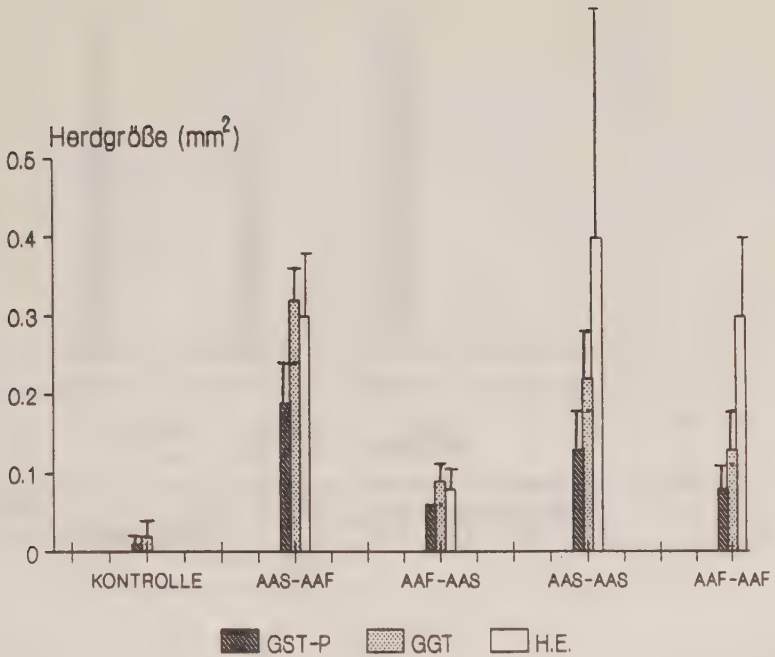


Abb.13: Vergleich der durchschnittlichen Herdgröße (mm²) nach unterschiedlicher Darstellung (GST-P, GGT, H.E.) nach 26-wöchiger Promotion ($\bar{x} \pm SE$, n = 3, erwachsene Ratten, PH + Pb).

Die GST-P-Färbung ergab den größten Herdflächenanteil. Wenn auch die Absolutwerte der GGT- und der H.E.-Schnitte geringer waren, blieben doch die Relationen zwischen einzelnen Behandlungsgruppen in allen Anfärbungen erhalten. Einzige Ausnahme waren die Werte der H.E.-Schnitte der AAF-AAS-Gruppe nach 26 Wochen (Abb.14).

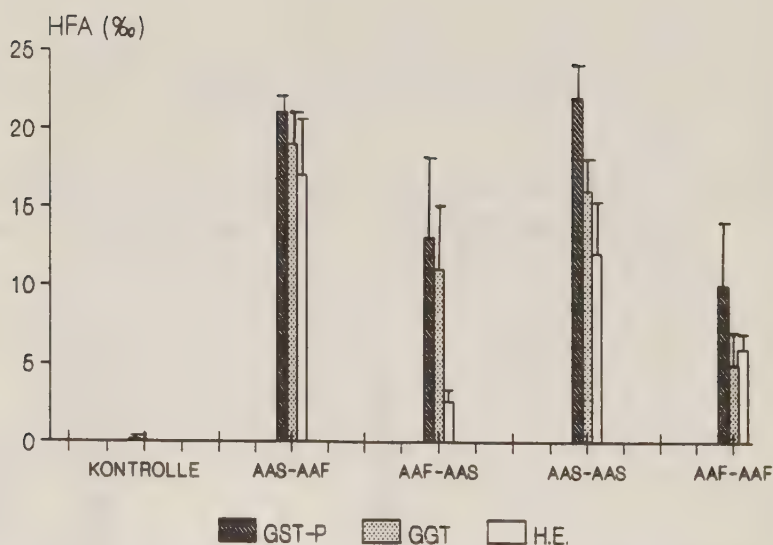


Abb.14: Vergleich des Herdflächenanteils (%) nach unterschiedlicher Darstellung (GST-P, GGT, H.E.) nach 26-wöchiger Promotion ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$, erwachsene Ratten, PH + PB)

Vergleich der unterschiedlichen Promotionsdauer

In allen Versuchsgruppen nahm die Zahl der Herde mit der Versuchsdauer zu (Abb.15). Die Herdgröße steigerte sich vor allem in den Gruppen, die bei der Initialbehandlung zuerst AAS erhalten hatten (Abb.16). In der AAS-AAF-Gruppe war dies noch deutlicher der Fall als bei den AAS-AAS-Tieren. Dies führte dazu, daß der Herdflächenanteil in dieser Gruppe nach 26 Wochen Promotionsdauer in der GGT- und H.E.-Anfärbung alle anderen Gruppen übertraf (Abb.14).

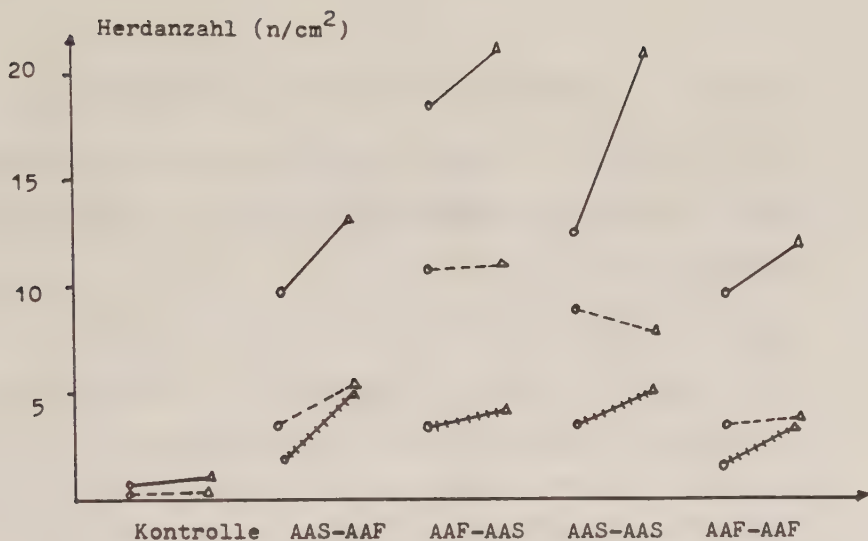


Abb.15 : Vergleich der Zunahme der Herdanzahl in den einzelnen Versuchsgruppen vom ersten zum zweiten Entnahmezeitpunkt. — GST-P, --- GGT, H.E.;
 o 13 Wo, Δ 26 Wo.

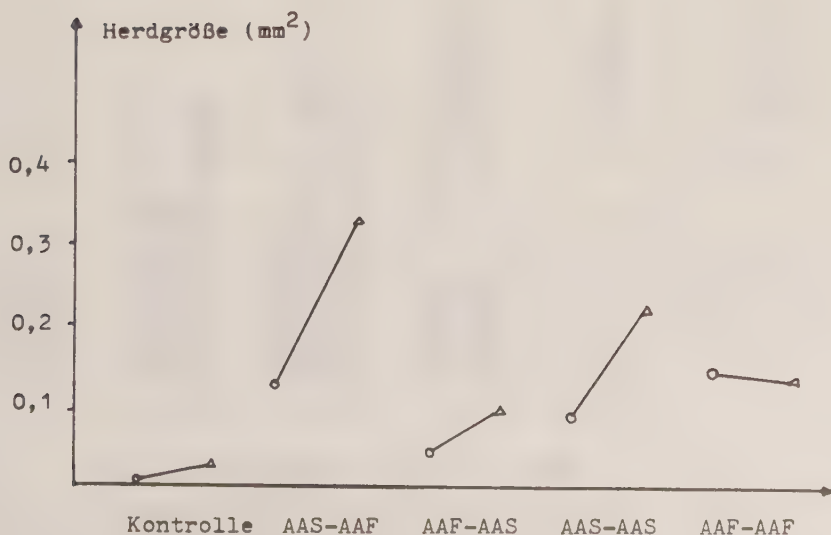


Abb.16 : Vergleich der Zunahme der Herdgrößen von der 13. bis zur 26. Woche der Promotion nach Darstellung der GGT.
 o 13 Wo, Δ 26 Wo.

Vergleich der Gruppen mit kombinierter Initialbehandlung

Beim Vergleich der Gruppen, denen AAS und AAF in unterschiedlicher Reihenfolge gegeben wurde, läßt sich folgendes festhalten:

a) Nach 13 Wochen war in der Reihenfolge AAF-AAS die Herdanzahl größer als bei AAS-AAF (Abb.17). Die Unterschiede lassen sich als schwach signifikant einstufen (GST-P-Darstellung ; $p \leq 0.05$). Gleiches gilt für die höhere Herdanzahl von AAF-AAS gegenüber AAF-AAF. Dagegen sind die Herde in der AAS-AAF-Reihenfolge signifikant ($p \leq 0.01$) größer als in der umgekehrten Sequenz (Abb.17).

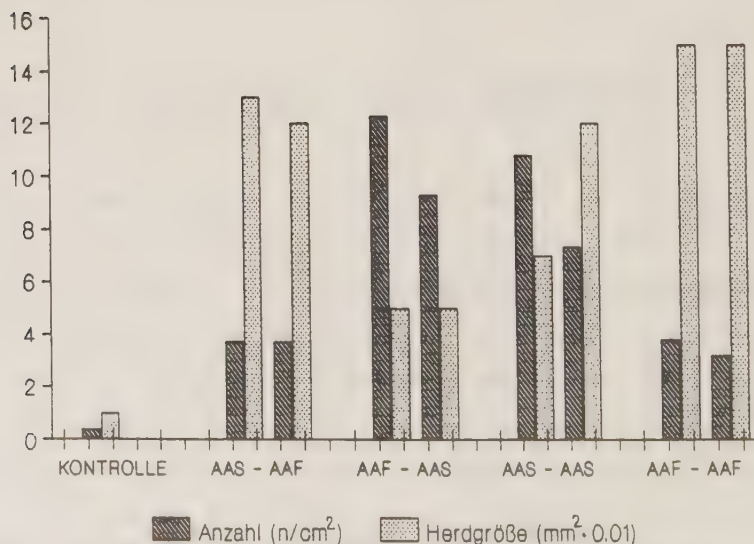


Abb.17: Vergleich von Herdanzahl (n/cm^2) und durchschnittlicher Herdgröße ($mm^2 \cdot 0.01$) nach GGT-Anfärbung nach 13 wöchige Promotion (Einzelwerte, erwachsene Ratten, PH + PB).

b) Nach 26 Wochen stieg der unter a) aufgeführte Unterschied in der Herdgröße auf mehr als das Dreifache, wobei sich bei H.E.- und GGT-Darstellung eine Signifikanz von $p \leq 0.01$ errechnen ließ. Der Unterschied in der Herdanzahl blieb annähernd erhalten (Abb.18).

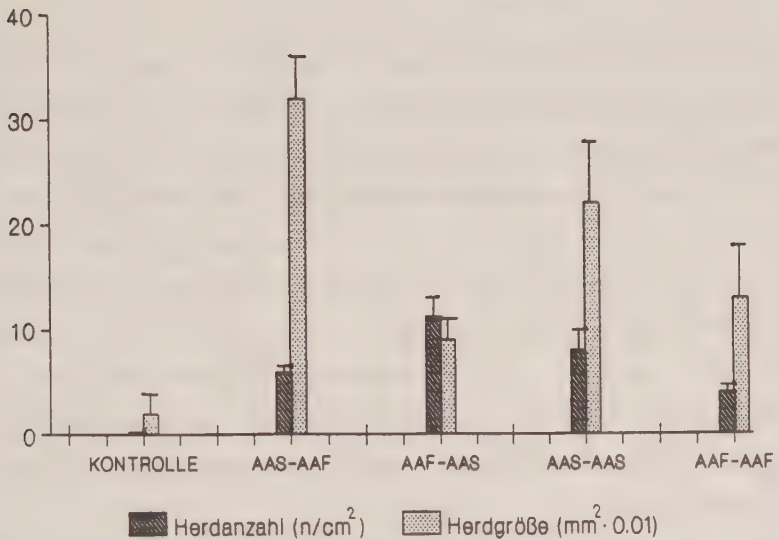


Abb.18: Vergleich von Herdanzahl (n/cm^2) und durchschnittlicher Herdgröße ($mm^2 \cdot 0.01$) nach GGT-Anfärbung nach 26-wöchiger Promotion ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$, erwachsene Ratten, PH + PB).

4.2. Initiations-Promotions-Versuch mit neugeborenen Ratten

4.2.1. Beobachtungen über den Zustand der Versuchstiere

4.2.1.1. Gewichtsentwicklung

Wie die Gewichtskurven (Abb.19, Abb.20) zeigen, konnten, mit jeweils einer Ausnahme, weder bei Weibchen, noch bei Männchen substanzbedingte Unterschiede ermittelt werden. Die Männchen der AAF/AAS-Simultangruppe nahmen nach dem Absetzen etwas stärker zu ($6,3 \pm 0,9$ g/d) als die der vergleichbaren AAS-AAF-Gruppe ($5,3 \pm 1,4$ g/d), die beide Substanzen nacheinander erhalten hatten, oder als die Kontrollgruppe ($5,3 \pm 1,2$ g/d). Später verliefen die Gewichtskurven wieder parallel, wenngleich die Gewichte der AAF/AAS-Gruppe immer geringfügig über denen der anderen Gruppen lagen. Der Unterschied war aber nicht signifikant.

Die Weibchen in der AAS-AAS-Gruppe nahmen nach dem Ende der Kanzerogenfütterung etwas weniger zu ($3,9 \pm 0,5$ g/d) als in der vergleichbaren AAF/AAS-Simultangruppe ($4,4 \pm 0,6$ g/d), die ja in der gleichen zeitlichen Anordnung die halbe Dosis AAS erhalten hatte. Die Kurven verliefen später wieder parallel. Der Abstand aus dieser Phase blieb bestehen. Reduziertes Allgemeinbefinden oder andere Hinweise auf akut-toxische Wirkungen lagen nicht vor.

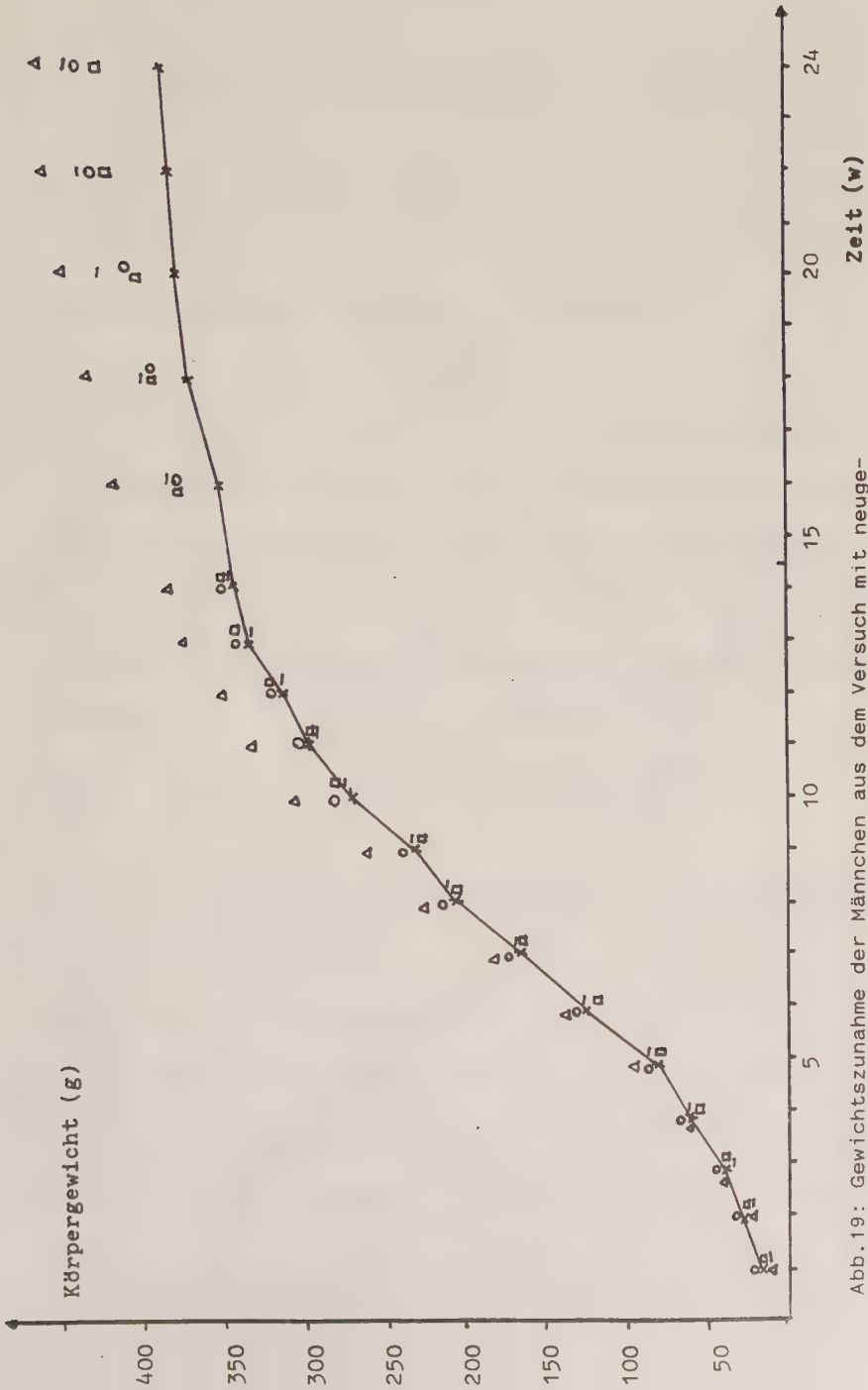


Abb. 19: Gewichtszunahme der Männchen aus dem Versuch mit neugeborenen Ratten. X Lösungsmittelkontrolle, □ AAS-AAF, Δ AAF/AAS, □ AAS-AAS, - AAF-AAF. Die ausgezogene Linie gibt den Verlauf bei den Kontrolltieren wieder (x, n = 4-8).

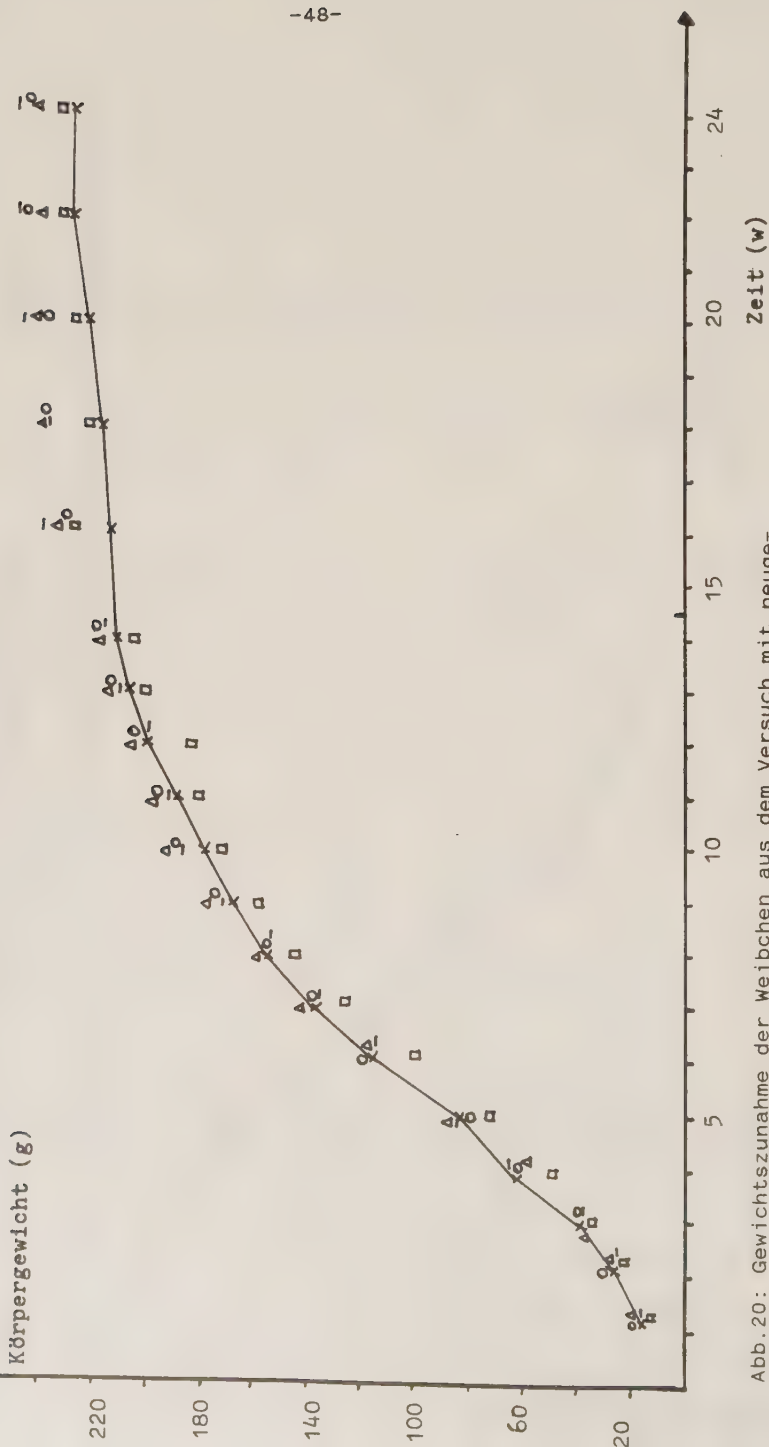


Abb. 20: Gewichtszunahme der Weibchen aus dem Versuch mit neugeborenen Ratten. x Lösungsmittelkontrolle, O AAS-AAF, Δ AAF/AAS, □ AAS-AAS, — AAF-AAF. Die durchgezogene Linie gibt den Verlauf bei den Kontrolltieren wieder (x, n = 4-8).

4.2.1.2. Lebergewichte und Beobachtungen bei der Gewebeentnahme

Weder bei den Weibchen, noch bei den Männchen unterschieden sich die Lebergewichte in auffälliger Weise (Tab. 3 u. 4). In der Mehrzahl der Gruppen war die relative Lebermasse zum zweiten Entnahmezeitpunkt niedriger als zum ersten.

Für die makroskopische Beschaffenheit der Lebern gelten, mit geringen Ausnahmen, die bei den erwachsenen Tieren des ersten Versuches gemachten Feststellungen. So wurden helle Stippchen nur in den Gruppen gesehen, die AAS oder nur AAS erhalten hatten. Zwei männliche Ratten, die beide Kanzerogene erhalten hatten, zeigten gelblich verfärbte, fleckige Nieren und eine geringgradige Erweiterung des Nierenbeckens. Bei zwei Weibchen der AAS-AAS-Gruppe fanden sich Ovarialzysten.

4.2.1.3. Gesundheitszustand der Versuchstiere

In der 31. Woche nach dem Absetzen wurde ein AAF/AAS-Männchen der Nachbeobachtungsgruppe (vgl. 3.3), nachdem es Nierensymptomatik gezeigt hatte, im Stadium der Pseudonormalurie euthanasiert. Die Nieren waren auch hier - ähnlich wie bereits vorher beschrieben - gelblich verfärbt. Es wurde eine starke Erweiterung des Nierenbeckens, Teilatrophie des Nierenparenchyms, sowie Konkrementbildung in allen harnableitenden Systemen und eine beginnende Pyelonephritis gesehen. Überdies hatte das Tier einen etwa 1,2 cm großen Knoten am Übergang des Lobus accessorius dexter zum Lobus accessorius sinister auf der

Tab. 3: Lebergewichte der Männchen aus dem Versuch mit neugeborenen Ratten ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)

Gruppen	Entnahmezeitpunkte			
	10 Wochen		20 Wochen	
	g	%KG	g	%KG
Kontrolle	16 ± 1	4.4	15.1 ± 0.6	3.9
AAS-AAF	15 ± 1	4.3	19.4 ± 0.7	4.3
AAF/AAS	17 ± 2	4.4	19 ± 2	4.0
AAS-AAS	15 ± 1	4.3	16.8 ± 0.4	3.9
AAF-AAF	14.0 ± 0.6	4.0	16.4 ± 0.6	4.0

Tab. 4: Lebergewichte der Weibchen aus dem Versuch mit neugeborenen Ratten. Angegeben sind Einzelwerte. Prozentangaben beziehen sich auf das arithmetische Mittel beider Werte.

Gruppen	Entnahmezeitpunkte			
	10 Wochen		20 Wochen	
	g	%KG	g	%KG
Kontrolle	9.9 9.1	4.2	9.7 7.7	3.8
AAS-AAF	9.3 8.5	4.0	9.7 7.9	3.9
AAF/AAS	8.9 7.6	3.9	10.7 9.5	3.9
AAS-AAS	8.9 7.7	3.9	9.2 8.3	4.0
AAF-AAF	9.3 8.3	4.1	11.0 9.3	4.0

Zwerchfellseite der Leber entwickelt. Es bestand eine leichte Verklebung mit dem Diaphragma.

4.2.2. Histologische Auswertung

Bei der Auswertung des Versuches mit neugeborenen Ratten wurden nur die Schnitte mit GGT- und GST-P-Anfärbung ausgezählt.

4.2.2.1. Allgemeinzustand der Gewebe

Die außerhalb der Herde gelegenen Gewebeanteile wiesen ein ruhigeres und gleichförmigeres Zellbild auf als im Versuch mit den erwachsenen Ratten. Mitosen waren nicht zu sehen. Dagegen konnten peliosisähnliche Erscheinungen auch bei den männlichen AAF-AAF-Tieren festgestellt werden. Bereits nach zehn Wochen wurden, besonders bei den Weibchen der AAS-AAS-Gruppe, kleine Cholangiofibrome gefunden.

4.2.2.2. Charakterisierung der fokalen Läsionen

Abweichend von den bereits gemachten Feststellungen ist zu erwähnen, daß bereits zum ersten Entnahmezeitpunkt in der GGT-Darstellung eine starke periportale Markierung entlang der Verlaufsrichtung der kleinen Gallengefäße auftrat. Diese fand sich gehäuft in der AAS-AAS-Gruppe, besaß teilweise netzartige Struktur, konnte aber morphologisch von den umschriebenen GGT-positiven Herden unterschieden werden. Ein Kontrolltier hatte in einem Leberlappen bis zur 20. Woche spontan einen großen GGT-positiven Herd entwickelt, der etwa ein Drittel des Schnitt-

tes einnahm. Da Ähnliches in keiner anderen Gruppe zu sehen war, wurde dieses Präparat bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die entsprechende Gruppe ist in der tabellarischen Übersicht gesondert gekennzeichnet. Bei den weiblichen AAS-AAS-Tieren waren die größeren Herde fast ausnahmslos gut demarkiert.

4.2.2.3. Quantitative Auswertung des Versuches mit neugeborenen männlichen Ratten

Die gesamten Resultate sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Einige Teilergebnisse werden wieder gesondert dargestellt.

Tab.5: Ergebnisse der Auswertung der histologischen Schnitte im Versuch mit neugeborenen Männchen (PB). Angegeben sind HFA, Herdanzahl und durchschnittl. Herdgröße nach 10 und 20 Wochen PB-Behandlung ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$).
-1 ein Lappen wurde nicht berücksichtigt

Gruppen		GGT			GST-P		
		HFA (%)	n/cm ²	Herdgr(mm ²)	HFA (%)	n/cm ²	Herdgr(mm ²)
10 Wochen	Kontrolle	0,04 ±0,02	0,4 ±0,2	0,01 ±0,01	0,06 ±0,04	0,3 ±0,2	0,01 ±0,01
	AAS-AAF	0,5 ±0,2	2,8 ±0,9	0,02 ±0	0,7 ±0,3	3 ±1	0,02 ±0
	AAF/AAS	0,83 ±0,09	3,6 ±0,6	0,02 ±0	1,3 ±0,3	7 ±2	0,02 ±0
	AAS-AAS	4,18 ±0,07	9 ±1	0,05 ±0,01	6 ±1	15 ±4	0,04 ±0,01
	AAF-AAF	0,4 ±0,1	2,4 ±0,5	0,02 ±0	0,7 ±0,2	4 ±1	0,02 ±0
20 Wochen	Kontrolle ⁻¹	0,06 ±0,01	0,59 ±0,06	0,01 ±0	0,3 ±0,1	1,8 ±0,9	0,01 ±0
	AAS-AAF	2,3 ±0,9	6 ±1	0,04 ±0,01	3,4 ±0,4	12 ±2	0,03 ±0,01
	AAF/AAS	3,0 ±0,6	11 ±2	0,03 ±0,02	3,4 ±0,8	13 ±3	0,03 ±0
	AAS-AAS	5 ±3	8 ±3	0,05 ±0,01	6 ±3	13 ±1	0,04 ±0,02
	AAF-AAF	1,3 ±0,2	5,0 ±0,3	0,03 ±0	1,6 ±0,2	6,0 ±0,2	0,03 ±0

Vergleich der Darstellungsmethoden:

Der Herdflächenanteil (Abb.21) und die Herdanzahl (Tab.5) liegen in der GST-P-Darstellung regelmäßig etwas höher als in der GGT-Darstellung.

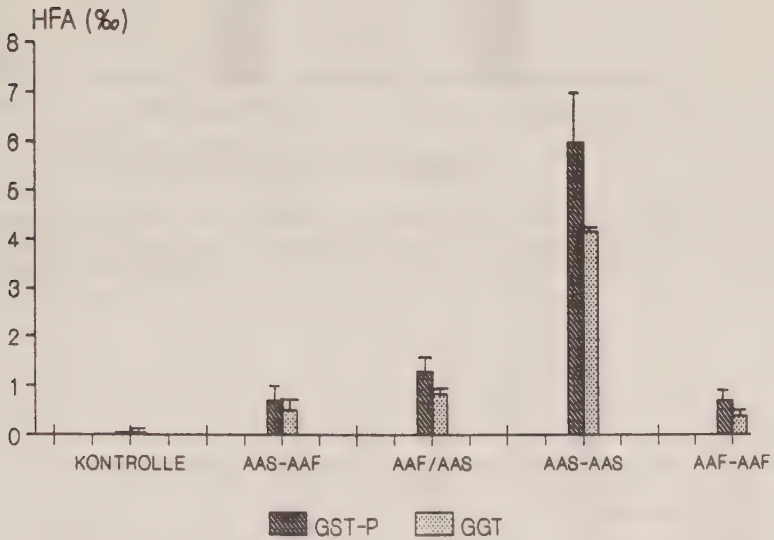


Abb.21: Vergleich des Herdflächenanteils (%) nach unterschiedlicher Darstellung (GST-P, GGT) nach 10-wöchiger Promotion ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$, neugeborene Männchen, PB).

Vergleich der sequentiellen und gemischten Exposition

Bei diesem Versuch sollte speziell die Frage geprüft werden, ob Unterschiede in der kombinierten Anwendung von AAS und AAF in Abhängigkeit von der Applikationsweise bestehen. Wie Abb.22 zeigt, unterschied sich die initiiierende Wirkung des Gemisches beider Kanzerogene nicht signifikant von der bei sequentieller Gabe.

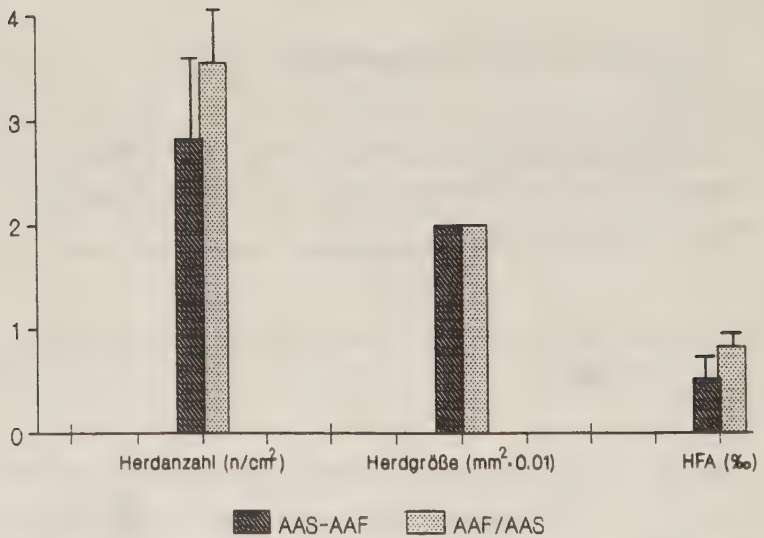


Abb.22: Vergleich der sequentiellen mit der gemischten Gabe von AAS und AAF nach GGT-Darstellung nach 10-wöchiger Promotion ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$, neugeborene Männchen, PB).

Vergleich der Versuchsgruppen nach unterschiedlicher Promotionsdauer

Nach der alleinigen Behandlung mit PB über 10 und 20 Wochen ließen sich sehr vereinzelt enzymveränderte Herde nachweisen. Bei Einsatz von AAS und AAF in der Initiationsphase wurden jedoch deutlich mehr Herde erzeugt (Abb.23).

Die Herdanzahl, wie auch die anderen Parameter, stiegen bis zur 20. Woche in allen Gruppen deutlich an, nur bei den AAS-AAS-Tieren war eine Stagnation zu verzeichnen (Abb. 23). Die AAF-AAF-Tiere lagen immer geringfügig unter den Kombinationsgruppen.

Bereits nach 10 Wochen hatten sich in der AAS-AAS-Gruppe mehr Herde gebildet als in allen anderen Gruppen ($p \leq 0.05$). Diese Herde waren auch bereits größer (GST-P-Darstellung, siehe Tab.5, $p \leq 0.05$). Dementsprechend war auch der Herdflächenanteil (Abb.21) deutlich größer (GST-P-Darstellung $p \leq 0.05$, GGT-Darstellung $p \leq 0.001$).

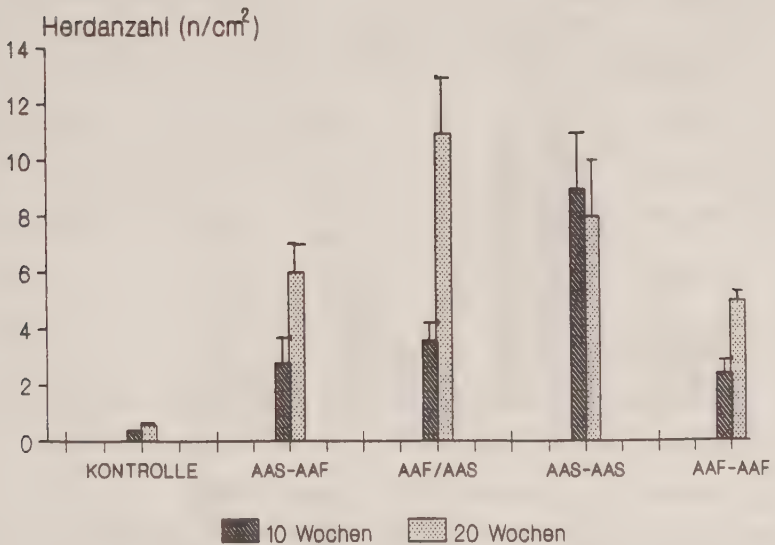


Abb.23: Vergleich der Herdzahl (n/cm^2) nach 10 und 20 Wochen nach GGT-Darstellung ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$, neugeborene Männchen, PB).

4.2.2.4. Quantitative Auswertung der Herde des Versuches mit neugeborenen weiblichen Ratten

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tab.6: Ergebnisse der Auswertung der histologischen Schnitte aus dem Versuch mit neugeborenen Weibchen (PB). Angegeben sind HFA, Herdanzahl und durchschnittl. Herdgröße nach 10 und 20 Wochen PB-Behandlung. Werte einzelner Tiere wurden entsprechend der Behandlung paarweise gruppiert.

Gruppen		GGT			GST-P		
		HFA (%)	n/cm ²	Herdgr (mm ²)	HFA (%)	n/cm ²	Herdgr (mm ²)
10 Wochen	Kontrolle	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	AAS-AAF	0,7	3,2	0,02	0,7	3,9	0,02
		0,4	1,3	0,03	0,4	1,6	0,03
	AAF/AAS	0,5	3,6	0,01	1,2	9,2	0,01
		0,8	3,8	0,02	0,7	4,2	0,02
	AAS-AAS	19,0	15,3	0,12	20,8	20,6	0,10
		14,8	18,0	0,08	16,9	20,6	0,08
	AAF-AAF	0,1	0,3	0,02	0,1	0,3	0,02
		0,6	2,9	0,02	0,9	4,4	0,02
20 Wochen	Kontrolle	0	0	0	0	0	0
		0,1	0,3	0,01	0,1	0,7	0,01
	AAS-AAF	2,8	5,5	0,05	2,9	7,0	0,04
		1,6	6,5	0,02	1,8	8,9	0,02
	AAF/AAS	3,5	7,8	0,05	2,8	9,8	0,03
		1,5	3,8	0,04	1,4	3,7	0,04
	AAS-AAS	6,9	15,4	0,04	8,3	27,6	0,03
		43,1	20,1	0,21	46,5	21,2	0,22
	AAF-AAF	1,6	5,9	0,03	1,8	6,4	0,03
		1,4	6,7	0,02	1,4	5,9	0,02

Bei den weiblichen Tieren waren die Effekte ausgeprägter als bei den Männchen. Nach 10 Wochen waren in der PB-Kontrolle keine, nach 20 Wochen nur in einem Fall Herde vorhanden. Sowohl Herdanzahl (Abb.24) als auch Herdgröße waren bei den nur mit AAS initiierten Tieren am höchsten. Daraus resultierte ein um

etwa den Faktor 20 größerer HFA im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb.25). Bei dieser Gruppe nahm Zahl und Größe der Herde nicht mehr zu (Abb.24). Ebenso war das Gemisch beider Initiatoren in etwa genauso wirksam, wie ihre sequentielle Applikation.

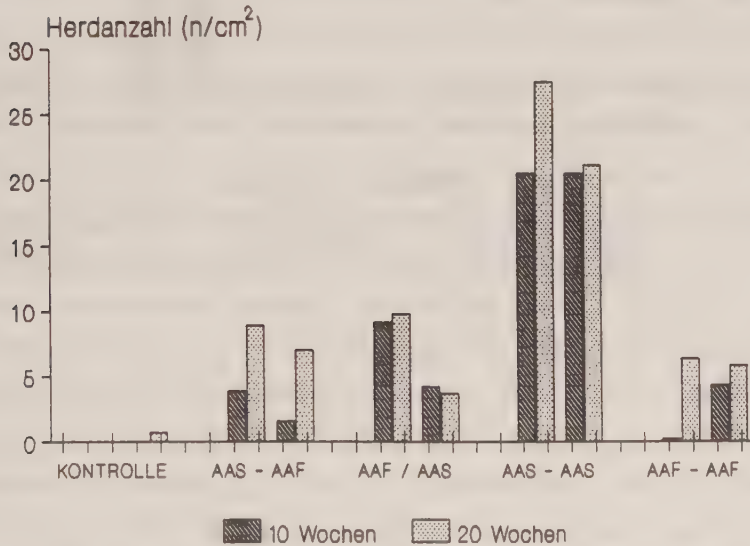


Abb.24: Vergleich der Herdanzahl (n/cm²) nach 10 und 20 Wochen in GST-P-Darstellung (Einzelwerte, neugeborene Weibchen, PB).

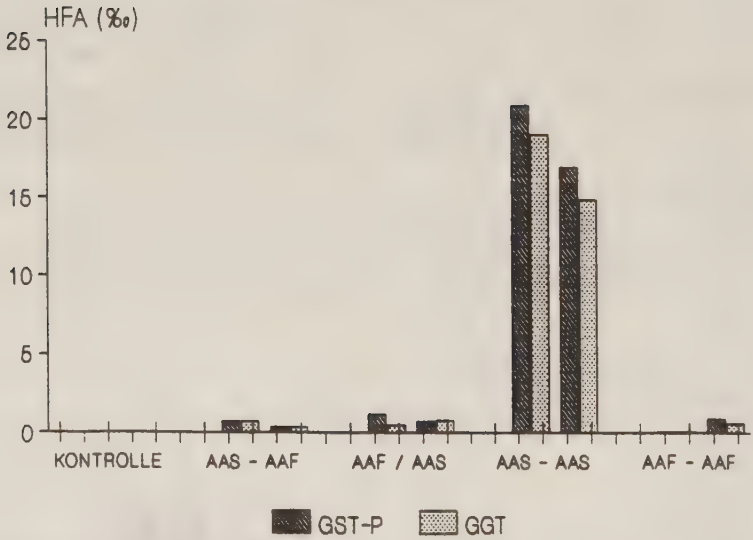


Abb.25: Vergleich des Herdflächenanteils (%) nach unterschiedlicher Darstellung (GST-P, GGT) nach 10-wöchiger Promotion (Einzelwerte, neugeborene Weibchen, PB).

5. DISKUSSION

Die Frage nach dem Zusammenwirken verschiedener Kanzerogene ist für die Risikobeurteilung von größter Bedeutung. Sie läßt sich experimentell aber nur sehr schwer untersuchen. So scheint es aussichtslos, alle denkbaren Kombinationen im Kanzerogeneseversuch mit dem Endpunkt Tumorentstehung zu testen. Dabei wird die Rolle der Initiation und Promotion nur ungenügend berücksichtigt. So läßt die Aussage, komplette Kanzerogene wirkten nur dann synergistisch, wenn sie die gleiche Organotropie besäßen (SCHMÄHL 1976), außeracht, daß das Risiko auch durch Addition gentoxischer Wirkungen erhöht wird, wenn das initiierte Zellen enthaltende Gewebe zusätzlich promovierendem Druck ausgesetzt wird.

Diese Überlegungen hatten zu Versuchen geführt, bei denen das Zusammenwirken von Kanzerogenen auf der Ebene der Initiation geprüft wurde (KUCHLBAUER et al. 1985). Dazu war eine Initiations-Promotions-Anordnung gewählt worden, bei der die zu prüfenden Substanzen in einem beschränkten Zeitraum von 4 Wochen, zur Vermeidung metabolischer Interaktionen zunächst getrennt, an Ratten verabfolgt worden waren. Diese Phase war als Initiationsphase bezeichnet und die dabei in der Leber initiierten Zellen durch partielle Hepatektomie und Phenobarbitalgabe im Trinkwasser promoviert worden. Bei den Substanzen hatte es sich um AAF, als bekanntes Hepatokanzerogen, und AAS gehandelt, von dem bekannt ist, daß es in der Leber keine Tumoren hervorruft, aber Zellen zu initiieren vermag (HILPERT und NEUMANN 1983). AAS erzeugt bei der Ratte mit hoher Selektivität Zym-

baldrüsentumoren. Bei beiden Verbindungen handelt es sich also um Kanzerogene mit unterschiedlicher Organotropie.

Das Ergebnis dieser Versuche war, daß die sequentielle Verabfolgung beider Substanzen deutlich mehr enzymveränderte Herde erzeugte, als die Gabe der Einzelsubstanzen in gleicher Dosis und im entsprechenden Zeitraum (KUCHLBAUER et al. 1985). Daraus wurde auf einen überadditiven Effekt bei der Initiation in der Leber geschlossen. Ein Einwand gegen die verwendete Versuchsanordnung bestand darin, daß der Faktor Zeit in der 4 Wochen dauernden Initiationsphase nicht ausreichend berücksichtigt worden war. So war AAS als Einzelsubstanz nur über einen Zeitraum verabfolgt worden, in dem bei der Kombination, nur die erste Serie von vier Dosen gegeben worden war. In der zweiten Hälfte der Initiation hatten die Tiere kein Kanzerogen erhalten. Es stellte sich daher die Frage, ob eine zweite Serie der gleichen Substanz einen additiven oder überadditiven Effekt bei der Initiation erzielen würde. Nach der Summationstheorie wäre gerade bei einem Überwiegend initiierenden Stoff wie dem AAS lediglich ein additiver Effekt zu erwarten.

Im vorliegenden Versuch deuten die starken Veränderungen, die von zwei Serien AAS erzeugt wurden, an, daß überadditive Effekte vorliegen. Im Sinne reiner Summation hätte die nun doppelte Dosis gegenüber dem vorherigen Experiment (KUCHLBAUER et al. 1985), nicht eine derart starke Wirkung haben dürfen. Besonders deutlich wird dies, wenn man die Resultate der reinen AAS-Gabe in beiden Experimenten im Verhältnis zu den Ergebnissen der jeweiligen Kombinationsgruppen betrachtet. In unserem Versuch wurden nur zwei Zeitpunkte ausgewertet. Gerade zu einem späteren Entnahmezeitpunkt waren aber von KUCHLBAUER (1985)

starke AAS-Wirkungen festgestellt worden. Eine eindeutige Antwort auf die Frage läßt sich deswegen nicht geben.

Mit einer Serie AAF wurden dagegen bei diesen früheren Experimenten zu keinem Zeitpunkt nennenswerte Gewebsveränderungen erzielt. In unserem Versuch erzeugten zwei Serien Läsionen, die durchaus in der Größenordnung der Kombinationsgruppen lagen. Dies spricht dafür, daß die Wirkung des kompletten Kanzerogens AAF stark von der zeitlichen Anordnung im Initiationsschema beeinflußt wird. AAF-Wirkungen hingen auch in anderen Versuchen stark von zeitlichen Dispositionen ab. TEEBOR und BECKER (1971) untersuchten unter ganz anderer Zielsetzung das Schicksal (Regression oder Persistenz) auftretender Gewebsläsionen. Dabei wurden mit drei jeweils dreiwöchigen AAF-Gaben nur Knoten erzeugt, die später der Regression verfielen. Eine weitere AAF-Sequenz dagegen brachte mit hoher Inzidenz persistierende Knoten und Karzinome hervor.

In unserer zweimaligen Verabfolgung von AAF könnten sich, in der doch insgesamt 4 Wochen dauernden Initiationsphase, promovierende Eigenschaften bemerkbar machen. Die während der Initiationsphase in diesem Modell ablaufenden Vorgänge können demnach nicht durch eine rein additive Wirkung auf die DNA beschrieben werden. Dies zeigt, daß die oben erwähnte Kritik am Initiationsschema nicht unbegründet ist.

Ein weiteres Ergebnis der ersten Versuche (KUCHLBAUER et al. 1985) war, daß entgegen den Erwartungen, die Reihenfolge der Verabfolgung der beiden Initiatoren einen Einfluß auf die Ausbeute an Veränderungen in der Leber hatte. Daraus war der Schluß gezogen worden, daß AAF zusätzlich zu den initiierenden auch promovierende Wirkungen ausgeübt hatte, die besonders dann

zum Tragen kamen, wenn es nach AAS gegeben wurde und die Entwicklung der durch AAS veränderten Zellen fördern konnte. Dieser Befund wurde im vorliegenden Versuch mit erwachsenen Tieren bestätigt. Das Ergebnis steht auch im Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren (ITO et al. 1980 , SCHWARZ et al. 1984). Es bedarf aber einer differenzierteren Betrachtung. Im Gegensatz zu den früheren Versuchen, besteht zum ersten Zeitpunkt praktisch kein Unterschied im Flächenanteil der enzymveränderten Herde an der Gesamtschnittfläche zwischen den Gruppen, die die Initiatoren in unterschiedlicher Reihenfolge erhielten. Dieser Unterschied wird erst zum zweiten Zeitpunkt und dann besonders im H.E.-Schnitt deutlich. Aber auch schon zum ersten Zeitpunkt sind Unterschiede vorhanden, wenn man die Zahl der Herde sowie die durchschnittliche Herdgröße betrachtet. Die Reihenfolge AAF-AAS brachte sehr viel mehr Herde hervor als die umgekehrte Reihenfolge AAS-AAF, deren Herde dagegen durchschnittlich deutlich größer waren. Diese Unterschiede bleiben auch bei Fortführung der Promotion erhalten. Vereinfacht könnte man daraus den Schluß ziehen, daß die Effekte vor allem durch die dem Beginn der Promotion nähere zweite Initiationsserie verursacht werden, und der Initiator AAS die Anzahl der Herde, der "Auch-Promotor" AAF vor allem deren Größe bestimmt. Erstaunlich dabei ist dennoch, daß die beiden AAS-Serien nicht mehr Herde erzeugten als die Gabe von AAF-AAS und die Herde dieser AAS-AAS-Gruppe nicht wesentlich kleiner waren als bei AAS-AAF.

Auch diese Beobachtungen zeigen, daß sich während der Initiationsphase bereits sehr komplexe Vorgänge abspielen. Die Vorstellung, daß bei gleichartiger Promotion aus der Zahl der durch diese Promotion hervorgebrachten Läsionen, auf das Aus-

maß der Initiation geschlossen werden kann, ist sicher zu einfach. Selbst die Dynamik, mit der sich Läsionen unter der Promotionsbehandlung entwickeln, wird durch Ereignisse in der Initiationsphase beeinflusst. AAS-initiierte Läsionen entwickeln sich dabei auffallend schnell. Entgegen den Erwartungen nimmt auch die Zahl der Herde noch zu. Das gilt vor allem für die GST-P-Darstellung, in weit geringerem Umfang auch für die anderen Färbemethoden.

Gemessen daran, daß der Herdflächenanteil der Kombination AAS-AAF am Ende des Versuches mit dem Endpunkt enzymveränderte Herde, genauso groß, oder noch größer ist, wie nach zweimaliger Applikation von AAS, könnte man von einem überadditiven Effekt sprechen. Bei der Kombination AAF-AAS liegen diese Werte zwischen den beiden Reinstoffgruppen, was man als additiven Effekt interpretieren könnte.

Am deutlichsten sind die Unterschiede zwischen beiden kombinierten Initiationen bei der Auswertung der H.E.-Schnitte. Wenn man davon ausgeht, daß hierbei vor allem die weiter vorgeschrittenen und weniger die noch sehr kleinen Veränderungen erfaßt werden - die Anzahl der Läsionen liegt niedriger als bei Darstellung der enzymveränderten Herde - fällt der hohe Herdflächenanteil der AAS-AAF-Gruppe besonders ins Gewicht. Der Befund stützt damit die Interpretation von überadditiven Effekten nach Initiation mit dieser Sequenz der beiden Kanzerogene.

Die Schwierigkeit, diese Befunde in Einklang mit den Kenntnissen über den molekularen Wirkungsmechanismus zu bringen, wird noch deutlicher, wenn man das Ergebnis aus dem zweiten Versuch mit neugeborenen Ratten hinzunimmt. Dabei werden keine

signifikanten Unterschiede gefunden zwischen der sequentiellen und der gleichzeitigen Initiation mit beiden Kanzerogenen. Dies bestätigt einerseits die von RUTHSATZ und NEUMANN (1988) bereits überprüfte, voneinander unabhängige Ausbildung von Primärläsionen an der DNA - metabolische Interaktionen spielen offensichtlich keine Rolle - zeigt aber andererseits, daß diese alleine das Geschehen nicht bestimmen können. Hier ergeben sich interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.

Als zweites Ergebnis, ist der in diesem Versuch noch deutlicher ausgefallene Unterschied zwischen der Initiation mit AAS und AAF hervorzuheben. Das wirft die Frage nach der Rolle der Proliferationsrate für die Fixierung des DNA-Schadens auf. Während im Versuch mit den neugeborenen Tieren die Kanzerogene auf eine proliferierende Leber treffen, erfolgt der Proliferationsstimulus durch die partielle Hepatektomie erst in einigem zeitlichen Abstand. Da dies aber in gleicher Weise für beide Initiatoren zutrifft, würden durch diese Interpretation die schwachen initiierenden Eigenschaften von AAF unterstrichen, nicht aber seine sonstige Wirksamkeit erklärt. Die promovierenden Eigenschaften des AAF können danach in der Leber neugeborener Tiere weniger zum Tragen kommen, woraus lediglich ein additiver Effekt bei der Kombination resultiert.

Insofern erscheint das vereinfachte Initiations-Promotions-Modell mit neugeborenen Ratten besonders geeignet, die initiierenden Eigenschaften von Kanzerogenen zu testen. Erfahrungen anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe (HORTER , KRESS - persönliche Mitteilung) stützen diese These, zumindest für die Effekte von AAS an der neonaten Rattenleber, auch ohne PB. Grundsätzlich lassen sich mit diesem Modell auch synergistische Wirkungen erfassen.

Im Einklang mit oben schon zitierten Quellen (TATEMATSU et al. 1985) stehen die Erkenntnisse über den Wert der GST-P-Darstellung im Vergleich zu anderen Methoden. Es wurden in einer einfachen Technik am Gefrierschnitt mehr Herde gefunden, einzelne Hepatozyten und Microfoci (MOORE et al. 1987) konnten dargestellt werden. Der einzige Nachteil resultiert aus der höheren Empfindlichkeit, die zu einem erhöhten Anteil relativ kleiner Herde in allen Gruppen führt, woraus sich weniger signifikante Herdgrößenunterschiede ergeben.

Lockere Aggregationen einzelner, deutlich positiver Hepatozyten, ohne direkte Zellkontakte, lassen die Theorie der klonalen Genese veränderter Herde schwer nachvollziehen. In den entsprechenden Gewebsschnitten fehlten große Läsionen, die, tangential geschnitten, solche Phänomene hätten ergeben können.

Einige große Herde der AAS-AAS- und der AAS-AAF-Gruppe im Versuch mit den erwachsenen Wistar Ratten verloren ihre GGT-Anfärbbarkeit in zentralen Bereichen ganz oder teilweise. Die GST-P-Darstellung dieser Herde war homogen positiv, was mit der bereits angeführten größeren phänotypischen Stabilität (TATEMATSU et al. 1988a) übereinstimmt. Ob die beobachtete Veränderung der GGT-Expression eher im Sinne einer Regression oder einer Progression zu interpretieren ist, kann hier nicht entschieden werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Frage, ob sich verschiedene Kanzerogene in ihrer Wirkung verstärken können, spielt für die Risikobeurteilung beim Menschen eine große Rolle. Experimentell läßt sie sich mit dem biologischen Endpunkt Tumor nicht befriedigend bearbeiten. In der vorliegenden Arbeit wurde die synergistische Wirkung zweier Modellverbindungen aus der Gruppe der aromatischen Amine (trans-4-Acetylaminostilben, AAS, und 2-Acetylaminofluoren, AAF) auf der Ebene der Initiation in Initiations/Promotions-Versuchen an der Rattenleber untersucht.

In einem ersten Versuch wurden die Substanzen innerhalb einer Initiationsphase von 4 Wochen in 2 Serien von je vier Gaben an erwachsene, weibliche Wistar Ratten peroral verabfolgt. Dabei wurden die beiden Verbindungen in unterschiedlicher Reihenfolge und getrennt voneinander (1 Serie AAS, 1 Serie AAF), oder eine von ihnen in beiden Serien eingesetzt. Alle Gruppen wurden einer einheitlichen Promotionsbehandlung, bestehend aus einer 2/3-Hepatektomie und nachfolgender Gabe von 250 ppm Phenobarbital im Trinkwasser, unterworfen. Die Lebern wurden 13 und 26 Wochen nach Beginn der Promotionsbehandlung auf enzymveränderte Herde (Expression von Gamma-Glutamyltranspeptidase, GGT und plazentare Form der Glutathion-S-Transferase, GST-P), sowie Hyperplasien und neoplastischen Knoten im H.E.-Schnitt, als frühe Stadien der Kanzerogenese, analysiert. Die Initiation mit AAS (8 x) war deutlich wirksamer als die Initiation mit AAF (8 x). Bei der Kombination beider Verbindungen spielte die Reihenfolge eine Rolle. Die Kombination AAF (4 x)-AAS (4 x) erzeugte zu beiden Zeitpunkten die größere Zahl von Veränderungen, während die einzelnen Herde in der Kombination AAS (4 x)- AAF (4 x) deutlich größer waren. Der Anteil ver-

änderter Fläche an der ausgewerteten Gesamtfläche der Schnitte war am Ende des Versuchs in der zweiten Anordnung größer.

In einem zweiten Versuch wurde ein vereinfachtes Initiations-Promotions-Modell verwendet. Neugeborene Ratten erhielten die Kanzerogene zur Initiation in je zwei Dosen pro Serie in den Tagen 6 - 14 nach der Geburt, zur Promotion 500 ppm Phenobarbital im Trinkwasser. Die Lebern wurden 10 und 20 Wochen nach dem Absetzen auf enzymveränderte Herde untersucht.

Die weiblichen Tiere waren deutlich empfindlicher als die Männchen. In diesem Versuch wurde, anders als im ersten, die sequentielle Initiation in der Reihenfolge AAS(2 x)-AAF (2 x) verglichen mit der Gabe des Gemisches beider Verbindungen AAS/AAF (4 x). Dabei traten keine signifikanten Unterschiede auf. Der Unterschied in der Wirksamkeit zwischen der Initiation nur mit AAS (4 x) und nur mit AAF (4 x) war in diesem Versuch noch deutlicher als im ersten Experiment.

Die Ergebnisse zeigen eine zumindest additive Wirkung der beiden Verbindungen bei der Initiation in diesen Modellen. Sie stehen im Einklang mit der Vorstellung, daß AAS ein starker Initiator für die Rattenleber ist und AAF außer den vergleichsweise schwächeren initiierenden auch promovierende Eigenschaften besitzt, die sich hier schon im Verlauf der Initiationsphase auswirken.

Grundsätzlich liefert das vereinfachte Modell, Initiation nach der Geburt, während die Leber noch stark proliferiert, die gleichen Aussagen. Quantitativ bestehen jedoch erhebliche Unterschiede zur Initiation bei erwachsenen Tieren mit nachfolgender partieller Hepatektomie. Auch ergaben sich in dem vereinfachten Modell keine Hinweise auf eine promovierende Wirkung des AAF während der Initiation.

SUMMARY

Synergistic effects of aromatic amines on initiation of hepatocarcinogenesis in rats

The question whether different carcinogens act synergistically is quite relevant for risk assessment in humans. Satisfactory answers are difficult to obtain with tumors as an end point in animal experiments. In the present work the synergistic effects of two aromatic amines (trans-4-acetylaminostilbene, AAS and 2-acetylaminofluorene, AAF) were studied on the level of initiation in an initiation-promotion experiment with rat liver.

In the first experiment the compounds were orally administered during a 4-week initiation period in two series of four doses each to female wistar rats. The compounds were given in different sequences (first AAS then AAF or the reverse). Two other groups received only one compound in both application series. All animals were subjected to the same promotional procedure consisting of a two third hepatectomy and subsequent administration of 250 ppm phenobarbital in drinking water.

Livers were screened for enzyme altered foci (expression of GGT and GST-P) as well as hyperplastic foci and neoplastic nodules 13 and 26 weeks after the beginning of promotional treatment. These parameters were considered early indicators of carcinogenesis.

Initiation with AAS (8x) was significantly more efficient than initiation with AAF (8x). When both compounds were combined, the efficiency depended on the sequence of administration. The combination AAF (4x) -AAS (4x) produced

a greater number of foci, whereas the reverse sequence AAS (4x) - AAF (4x) produced larger foci. The fraction of the area covered by enzyme altered foci from the total area screened was larger in the latter combination.

In the second experiment a simplified initiation promotion model was used. Newborn rats received two series of initiating treatment consisting of two doses each between days 6 and 14 after delivery. After weaning 500 ppm phenobarbital were administered in drinking water. Livers were screened 10 and 20 weeks after weaning.

Females were more susceptible than males. In this protocol sequential treatment with AAS (2x) and AAF (2x) was compared to the mixed exposure with AAF/AAS (4x). This comparison revealed no significant difference. Initiation with AAS (4x) was even more efficient than with AAF (4x) compared to the previous experiment.

The results indicate that the initiating effects of both compounds are at least additive in both models. This is consistent with the idea that AAS is a strong initiator for rat liver and AAF in addition to its relatively weak initiating has also promoting properties which have a modulating effect during the initiation period.

The simplified model using newborn rats, with their livers still proliferating, provides basically the same results as the other model. There are however considerable quantitative differences and promoting effects of AAF during initiation could not be seen with newborn animals.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSEN R A, ENOMOTO M, MILLER E C, MILLER J A (1964)

Carcinogenesis and inhibition of the Walker 256 tumor in the rat by trans-4-acetylaminostilbene, its N-hydroxy metabolite, and related compounds.

Cancer Res 24: 128-143

BANNASCH P (1976)

Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules.

Cancer Res 36: 2555-2562

BAUER K H (1963)

Das Krebsproblem.

Springer-Verlag

BERENBLUM J, SHUBIK P (1947)

The role of croton oil application associated with a single painting of carcinogen in tumor induction of the mouse skin.

Br J Cancer 1: 379-391

BÖRNER P, GÖSSNER W (1968)

Enzymhistochemische Untersuchungen der Adenosin-Triphosphatase, der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der Succinodehydrogenase im Leberparenchym der Ratte während der Einwirkung des Cancerogens Diäthylnitrosamin.

Z Naturforschung 19b: 1085-1091

COLUMBANO A, RAJALAKSHMI S, SARMA D S R (1981)

Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures.

Cancer Res 41: 2079-2083

CRAMER J W, MILLER J A, MILLER E C (1960)

N-Hydroxylation: a new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2-acetylaminofluorene.

J Biol Chem 235: 885-888

DRUCKREY H, KÜPFMÜLLER K (1948)

Quantitative Analyse der Krebsentstehung.

Z Naturforschung 3b: 254-266

EMMELOT P, SCHERER E (1980)

The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach.

Biochim Biophys Acta 605: 247-304

ENZMANN H, BANNASCH P (1988)

Non-persisting early foci of altered hepatocytes induced in rats by N-nitrosomorpholine.

J Cancer Res Clin Oncol 114: 30-34

FARBER E, PARKER S, GRUENSTEIN M (1976)

The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens.

Cancer Res 36: 3879-3887

FRANZ R, NEUMANN H G (1986)

Identification of nucleic acid adducts from trans-4-acetylaminostilbene.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 322: 223

FRANZ R, SCHULTEN H R, NEUMANN H G (1986)

Identification of nucleic acid adducts from trans-4-acetylaminostilbene.

Chem -Biol Interactions 59: 281-293

GHOSHAL A H, MULLEN B, MEDLINE A, FARBER E (1983)

Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: regeneration of liver after carbontetrachloride-induced liver necrosis when hepatocyte proliferation is inhibited by 2-acetylaminofluorene.

Lab Invest 48: 224-230

GÖSSNER W, FRIEDRICH-FRESKA H (1964)

Histochemische Untersuchungen über die Glukose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Cancerisierung durch Nitrosamine.

Z Naturforschung 19b: 862-863

GOLDSWORTHY T, CAMPBELL H A, PITOT H C (1984)

The natural history and dose response characteristics of enzyme-altered foci in the rat liver following phenobarbital and diethylnitrosamine administration.

Carcinogenesis 5: 67-71

HABIG W H, JAKOBY W B (1981)

Glutathione S-transferases (rat and human)

Methods in Enzymology 77: 218-231

HADDOW A, HARRIS R J C, KON G A R, ROW E M F (1948)

The growth-inhibitory and carcinogenic properties of 4-aminostilbene derivatives.

Phil Trans Roy Soc London 241: 147-195

HANIGAN M H, PITOT H C (1985)

Gamma-glutamyl transpeptidase - its role in hepatocarcinogenesis.

Carcinogenesis 6: 165-172

HASHIMOTO Y, TAKEDA K, SHUDO K, OKAMOTO T, SUGIMURA T, KOSUGE T (1978)

Rat liver microsome-mediated binding to DNA of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido-(4,3-b)-indole, a potent mutagen isolated from tryptophan pyrolysate.

Chem -Biol Interact 23: 137-140

HENDRICH S, CAMPBELL H A, PITOT H C (1987)

Quantitative stereological evaluation of four histochemical markers of altered foci in multistage hepatocarcinogenesis in the rat.

Carcinogenesis 8 : 1245-1250

HILPERT D, NEUMANN H G (1983)

The effects of partial hepatectomy and of promoters on macromolecular binding of trans-4-acetylaminostilbene metabolites in liver and some extrahepatic tissues of rats.

Carcinogenesis 4: 1527-1533

ITO N, TATEMATSU M, NAKANISHI K, HASEGAWA R, TAKANO T, IMAIDA K, OGISHO T (1980)

The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-fluorenylacetamide.

Gann 71: 832-842

ITO N, TSUDO H, HASEGAWA R, IMAIDA K (1983)

Comparison of the promoting effects of various agents in induction of preneoplastic lesions in rat liver.

Environ Health Persp 50: 131-138

JENSSON H, ERIKSSON L C, MANNERVIK B (1985)

Selective expression of glutathione transferase isoenzymes in chemically induced preneoplastic rat hepatocyte nodules.

FEBS Lett 187: 115-120

KALENGAYI M M R, DESMET V J (1975)

Sequential histological and histochemical study of rat liver during Aflatoxin B₁-induced carcinogenesis.

Cancer Res 35: 2845-2852

KITAHARA A, SATOH K, NISHIMURA K, ISHIKAWA T, RUIKE K, SATO K, TSUDA H, ITO N (1984)

Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis.

Cancer Res 44: 2698-2703

KODATE C, FUKUSHI A, NARITA T, KUDO H, SOMA Y, SATO K (1986)

Human placental form of glutathione S-transferase (GST-) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma.

Gann 77: 226-229

KRIEK E (1969)

On the mechanism of action of carcinogenic aromatic amines.

I) Binding of 2-acetylaminofluorene and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to rat liver nucleic acids in vivo.

Chem Biol Interact 1: 3-17

KUCHLBAUER J (1985)

Untersuchungen über synkarzinogene Wirkungen von Trans-4-Acetylaminostilben und 2-Acetylaminofluoren an der Rattenleber.

Diss med, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

KUCHLBAUER J, ROMEN W, NEUMANN H G (1985)

Syncarcinogenic effects on the Initiation of rat liver tumors by trans-4-acetylaminostilbene and 2-acetylaminofluorene.

Carcinogenesis 6: 1337-1342

LAIB R J, KLEIN K P, BOLT H M (1984)

The rat liver foci bioassay:

I) Age-dependence of induction by vinylchloride of ATPase-deficient foci.

Carcinogenesis 5 (accompanying paper)

LAIB R J, PELLIO T, WÜNSCHEL U M, ZIMMERMANN N, BOLT H M (1985)

The rat liver foci bioassay:

II) Investigations on the dose-dependent induction of ATPase-deficient foci by vinyl chloride at very low doses.

Carcinogenesis 6: 69-72

MANNERVIK B, GUTHENBERG C (1981)

Glutathione transferase (human placenta).

Methods in Enzymology 77: 231-235

MARQUARDT P, ROMEN W, NEUMANN H G (1985)

Tissuespecific, acute toxic effects of the carcinogen trans-4-dimethylaminostilbene.

Arch Toxicol, 56: 151-157

METZLER M, NEUMANN H G (1971)

Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine.

III) Synthese und Analytik einiger Stoffwechselprodukte von trans-4-Dimethylaminostilben, cis-4-Dimethylaminostilben und 4-dimethylaminobibenzyl.

Tetrahedron 27: 2225-2246

MILLER E C, MILLER J A (1969)

The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides.

Prog Exp Tumor Res 11: 273-301

MOORE M A, SATOH K, KITAHARA A, SATO K, ITO N (1985)

A protein cross-reacting immunohistochemically with rat glutathione S-transferase placental form as a marker for preneoplasia in Syrian hamster pancreatic and hepatocarcinogenesis.

Gann 76: 1-4

MOORE M A, NAKAMURA T, ITO N (1986)

Immunohistochemically demonstrated glucose-6-phosphatase dehydrogenase, gamma-glutamyltranspeptidase, ornithine decarboxylase and glutathione S-transferase enzymes: absence of direct correlation with cell proliferation in rat liver putative preneoplastic lesions.

Carcinogenesis 7: 1419-1424

MOORE M A, NAKAGAWA K, SATOH K, ISHIKAWA T, SATO K (1987)

Single GST-P positive liver cells - putative initiated hepatocytes

Carcinogenesis 8: 483-486

NAKAHARA W, FUKUOKA F (1960)

Summation cancerogener Wirkungen von chemisch verschiedenartigen Cancerogenen.

Naturwissenschaften 47: 44-45

NEBERT D W, BIGELOW S W, OKEY A B, YAHAG T, MORI Y, NAGO M, SUGIMURA T (1979)

Pyrolysis products from amino acids and protein:

Highest mutagenicity requires cytochrome P1-450

Proc Natl Acad Sci USA 76: 5929-5933

NEUMANN H G (1986)

The role of DNA damage in chemical carcinogenesis of aromatic amines.

J Cancer Res Clin Oncol 112: 100-106

NEUMANN H G (1987)

Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva.

In: Forth W, Henschler D, Rummel W (Hrsg.)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

5. Auflage. Mannheim Wien Zürich, 716-738

NEUMANN H G, METZLER M, BRACHMANN I, THOMAS C (1970)

Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die
toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine.

I) Krebserzeugenden Wirksamkeit einiger 4-Aminostilben- und 4-
Aminobiphenyl-Verbindungen.

Z Krebsforsch 74: 200

ODASHIMA S (1960)

Development of liver cancers in rat by 4-dimethylaminostilbene
(DAS) feeding following initial 4-dimethylaminoazobenzene (DAB)
feeding.

I) Examination of the rat fed initially with DAB for more than one
month.

Gann 51: 148

ODASHIMA S (1962)

Combined effect of carcinogens with different actions.

I) Development of liver cancer in the rat by the feeding of 4-
dimethylaminostilbene following initial feeding of 4-
dimethylaminoazobenzene.

Gann 53: 247-257

PERAINO C, FRY M R J, STAFFELDT E, (1971)

Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene.

Cancer Res 31: 1506-1512

PERAINO C, FRY M, STAFFELDT E, KIVIELSKI W (1973)

Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat.

Cancer Res 33: 2701-2705

PERAINO C, FRY M R J, STAFFELDT E, CHRISTOPHER J P (1975)

Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat.

Cancer Res 35: 2884-2890

PERAINO C, FRY M R J , STAFFELDT E (1977)

Effect of varying the onset and duration of exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis

Cancer Res 37: 3623-3627

PERAINO C, STAFFELDT E F, HAUGEN D A, LOMBARD L S, STEVENS F J, FRY M R J (1980)

Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis.

Cancer Res 40: 3268-3273

PERAINO C, STAFFELDT E F, LUDEMAN V A (1981)

Early appearance of histochemically altered hepatocyte foci and liver tumors in female rats treated with carcinogens one day after birth.

Carcinogenesis 2: 463-465

PIKE S F, SHEPHARD E A, RABIN B R, PHILLIPS I R (1985)

Induction of cytochrome P-450 by phenobarbital is mediated at the level of transcription.

Biochem Pharmacol 34: 2489-2494

PITOT H C, CAMPBELL H A (1987)

An approach to the determination of the relative potencies of chemical agents during the stages of initiation and promotion in multistage hepatocarcinogenesis in the rat.

Environ Health Persp 76: 49-56

PITOT H C, BORSNESS L, GOLDSWORTHY T, KITAGAWA T (1978)

Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine.

Nature 271: 456-458

PITOT H C, GLAUERT H P, HANIGAN M (1985)

The significance of selected biochemical markers in the characterization of putative initiated cell populations in rodent liver.

Cancer Lett 29: 1-14

POTTER V R (1984)

Use of two sequential applications of initiators in the production of hepatomas in the rat: an examination of the Solt-Farber protocol.

Cancer Res 44: 2733-2736

REHN L (1895)

Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern.

Arch Klin Chirurgie 50: 588-600

RUTHSATZ M, NEUMANN H G (1988)

Synergistic effects on the initiation of rat liver tumors by trans-4-acetylaminostilbene and 2-acetylaminofluorene, studied at the level of DNA adduct formation.

Carcinogenesis 9: 265-269

SAETER G, SCHWARZE P E, NESLAND J M, SEGLEN P O (1988)

2-Acetylaminofluorene promotion of liver carcinogenesis by a non-cytotoxic mechanism.

Carcinogenesis 9: 581-587

SATO K, KITAHARA A, SATOH K, ISHIKAWA T, TATEMATSU M, ITO N (1984)

The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis.

Gann 75: 199-202

SCHERER E (1984)

Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis.

Biochim Biophys Acta 738: 219-236

SCHERER E, EMMELOT P (1975)

Foci of altered liver cells induced by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy: their contribution to hepatocarcinogenesis in the rat.

Eur J Cancer 11: 689-696

SCHERER E, EMMELOT P (1984)

Initiation-promotion-initiation induction of secondary foci and microcarcinoma within islands of precancerous liver cells in the rat: the role of cocarcinogens and promoters in human and experimental hepatocarcinogenesis.

I A R C Sci Publ

SCHMÄHL D (1976)

Combination effects in chemical carcinogenesis (experimental results).

Oncology 33: 73-76

SCHMÄHL D, THOMAS C (1965)

Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese.

4. Mitteilung: Versuche zur Krebs erzeugung an Ratten bei gleichzeitiger oraler Gabe von Diäthylnitrosamin und 4-Dimethylaminostilben.

Z Krebsforschung 67: 135-140

SCHMÄHL D, MECKE R (1956)

Quantitative Untersuchungen der carcinogenen Wirksamkeit von 4-Aminostilben.

Z Krebsforsch 61: 230-239

SCHMÄHL D, OSSWALD H (1967)

Die carcinogene Wirkung von Diäthylnitrosamin bei verschiedenen Tierarten.

Experientia 23: 497

SCHMÄHL D, THOMAS C, KÖNIG K (1963)

Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. 1.Mitteilung: Versuche zur Krebserzeugung an Ratten bei gleichzeitiger Applikation von Diäthylnitrosamin und 4-Dimethylamino-azobenzol.

Z Krebsforschung 65: 342-350

SCHULTE-HERMANN R, ROOME N, TIMMERMANN-TROSIENER I, SCHUPPLER J (1984)

Immunocytochemical demonstration of a phenobarbital-inducible cytochrome P 450 in putative preneoplastic foci of rat liver.

Carcinogenesis 5: 149-153

SCHWARZ M, PEARSON D, PORT R, KUNZ W (1984)

Promoting effect of 4-dimethylaminoazobenzene on enzyme altered foci induced in rat liver by N-nitrosodiethanolamine.

Carcinogenesis 5: 725-730

SIMONS P C, VANDER JAGT D L (1981)

Purification of glutathione S-transferases by glutathione-affinity chromatography.

Methods in Enzymology 77: 235-237

SOLT D, FARBER E (1976)

New principle for the analysis of chemical carcinogenesis.

Nature 263: 701-703

SQUIRE R A, LEVITT M H (1975)

Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats.

Cancer Res 35: 3214-3223

SUGUKA Y, KENO T, OKUDA A, SAKAI M, KITAGAWA T, MURAMATSU M (1985)

Cloning and the nucleotide sequence of rat glutathione S-transferase P cDNA.

Nucleic Acids Research 13: 6049-6057

TATEMATSU M, SHIRAI T, TSUDA H, MIYATA Y, SHINOHARA Y, ITO N (1977)

Rapid production of hyperplastic liver nodules in rats treated with carcinogenic chemicals: a new approach for an in vivo short-term screening test for hepatocarcinogens.

Gann 68: 499-507

TATEMATSU M, HASEGAWA R, IMAIDA K, TSUDA H, ITO N (1983)
Survey of various chemicals for initiating and promoting
activities in a short-term in vivo system based on generation of
hyperplastic liver nodules in rats.
Carcinogenesis 4: 381-386

TATEMATSU M, MERA Y, ITO N, SATOH K, SATO K (1985)
Relative merits of immunohistochemical demonstrations of
placental, A, B, C forms of glutathione-S-transferase and
histochemical demonstration of gamma-glutamyl transferase as
markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats.
Carcinogenesis 6: 1621-1626

TATEMATSU M, MERA Y, INOUE T, SATOH K, SATO K, ITO N (1988 a)
Stable phenotypic expression of glutathione S-transferase
placental type and unstable phenotypic expression of gamma-
glutamyl transferase in rat liver preneoplastic and neoplastic
lesions.
Carcinogenesis 9: 215-220

TATEMATSU M, AOKI T, KAGAWA M, MERA Y, ITO N (1988 b)
Reciprocal relationship between developement of glutathione S-
transferase positive liver foci and proliferation of surrounding
hepatocytes in rats.
Carcinogenesis 9: 221-225

TEEBOR G W, BECKER F F (1971)

Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis.

Cancer Res 31: 1-3

TSUDA H, HASEGAWA R, IMAIDA K, MASUI T, MOORE M A, ITO N (1984):

Modifying potential of thirty-one chemicals on the short-term development of gamma-glutamyl transpeptidase-positive foci in diethylnitrosamine-initiated rat liver.

Gann 75: 876-883

WILLIAMS G M (1976)

Functional markers and growth behavior of preneoplastic hepatocytes.

Cancer Res 36: 2540-2543

WILLIAMS G M (1980)

The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens.

Biochim Biophys Acta 605: 167-189

WILSON R H, DeEDS F, COX A J (1941)

The toxicity and carcinogenic activity of 2-acetylaminofluorene.

Cancer Res 1: 595-608

Bei Herrn Professor Dr. D. Henschler bedanke ich mich herzlich für sein förderndes Interesse und die gewährten Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Dem Sonderforschungsbereich 172 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg gilt mein Dank für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit und die Bereitstellung von Mitteln.

Herrn Professor Dr. H. G. Neumann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für das große Verständnis.

Bei Herrn Professor Dr. A. Petter bedanke ich mich herzlich für die Durchsicht der Arbeit und die wohlwollende Beratung.

Herrn Dr. habil. Th. Kirchner danke ich herzlich für die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung, Auswertung und Darstellung der patho-histologischen Teile der Arbeit.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme, für die immer vorhandene solidarische Unterstützung und für viele wertvolle, kritische Anregungen. Dabei danke ich besonders Frau E. Rüb-Spiegel für die Hilfe bei der Durchführung der Hepatektomie, sowie Frau I. Fenske und Frau B. Schuricht für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Lebenslauf

Roland Hermann Hammerl

Geboren: am 25. Dezember 1961 in Würzburg

Eltern: Franz Hammerl, Maschinenschlosser
Käthe Hammerl, geb. Dressel

Schulbildung: 1968-72 Verbandsgrundschule Geroldshausen
1972-81 Röntgen-Gymnasium Würzburg
Juni 81 Abitur

Wehrdienst: Juli 81 in Koblenz
Sept 81 in Veitshöchheim

Studium: 1982-87 Studium der Tiermedizin
an der LMU München
Okt. 87 Abschluß des Staatsexamens
Dez. 87 Approbation als Tierarzt

